

UNTERSUCHUNGEN ZU DEN MULTIPLLEN FORMEN
DER RNA POLYMERASE C AUS RATTENLEBER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)
eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

JAIME A. GASCA J.
aus Venezuela

Marburg/Lahn 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNTERSUCHUNGEN ZU DEN MULTIPLLEN FORMEN
DER RNA POLYMERASE C AUS RATTENLEBER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

JAIME A. GASCA J.

aus Venezuela

Marburg/Lahn 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am 24.11.1976
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Human-
medizin

Dekan: Prof. Dr. med. Neurath

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karlson

Korreferent: Prof. Dr. med. Niessing

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Physiologische Chemie I
der Philipps-Universität in Marburg
auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. K.H. Seifart,
dem mein Dank gilt, da er mich in
das Arbeitsgebiet eingeführt und
betreut hat.

Ebenfalls danke ich dem Direktor des
Instituts für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg,

Herrn Prof. Dr. P. Karlson
für die Förderung dieser Arbeit, sowie

La Universidad de Oriente, Venezuela
für die finanzielle Unterstützung.

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einführung	1
2. Material und Methoden	7
2.1. Material	7
2.2. Methoden	8
3. Ergebnisse	13
3.1. Reinigung der RNA Polymerase C	13
3.2. Charakterisierung der Polymerasen CI und CII	17
3.2.1. Dichtegradientenzentrifugation	17
3.2.2. Hemmung durch α -Amanitin	19
3.2.3. Untersuchungen zur Aggregation der Polymerase CII	21
3.2.4. Dichtegradientenzentrifugation bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen	21
3.2.5. Chromatographische Eigenschaften der Polymerasen CI und B	24
3.2.6. Hemmung der Polymerase CI und B nach DEAE-Sephadex Chromatographie durch α -Amanitin	24
3.3. Gewinnung der Enzyme CI-a, CI-b, CI-c, CII-a, und CII-b	26
3.3.1. Charakterisierung der fünf C-Kompo- nenten	27
3.3.2. Hemmung durch α -Amanitin	27
3.3.3. Dichtegradientenzentrifugation	30

3.3.4.	Matrizenabhängigkeit	33
3.3.5.	Chromatographische Eigenschaften der C-Enzyme in Abhängigkeit von der Reinigungsprozedur	36
3.3.6.	Rechromatographie der Polymerase CI	37
3.3.7.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese der fünf Enzymkomponenten	39
3.3.8.	DNA-Affinitätschromatographie	44
4.	Diskussion	49
5.	Zusammenfassung	61
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	63
7.	Literaturverzeichnis	64

1. Einführung

Das Verständnis der Regulation der Transkription in eukaryonten Zellen ist eines der zentralen Probleme der molekularen Biologie. Es wird heute allgemein angenommen, daß die Grundvorgänge der Entwicklung und Differenzierung genetisch programmiert sind, und daß diese Information im Laufe der Entwicklung abgerufen wird. Der Vorgang der Transkription vermittelt zwischen der genetischen Information, die in der DNA festgelegt ist, und der Proteinsynthese. Diese Information muß zunächst von der DNA auf die RNA übertragen werden, und diese Aufgabe wird von der DNA-abhängigen RNA Polymerase durchgeführt.

Während bei Prokaryonten eine einzelne RNA Polymerase für die Synthese aller zellulären RNA Formen verantwortlich ist (P. Chambon, 1974), kommt dieses Enzym bei eukaryonten Zellen in multiplen Formen vor. Diese unterscheiden sich in ihren chromatographischen und katalytischen Eigenschaften (Roeder, 1969 a; Roeder 1969 b; Watson, 1970; Adman et al., 1972; Roeder, 1974 a, b; Schwartz et al., 1974; Sergeant und Krsmanovic, 1973; Seifart und Benecke, 1975; Weinmann, 1974 a, b; Chertont und Butterworth, 1971 a, b, c; Chambon, 1975 a), sowie durch unterschiedliche Funktionen in der Zelle (Weinmann, 1974 a; Roeder et al., 1974 c; Udvardy und Seifart, 1976).

Die multiplen Formen der RNA Polymerasen aus Seeigel-
eiern und Rattenleber werden bei der DEAE-Sephadex Chroma-
tographie in drei Aktivitätsgipfel eluiert. Roeder und
Rutter (1969 b) bezeichneten diese drei Kernenzyme als
I, II, und III nach ihrem Elutionsverhalten während
der DEAE-Sephadex Chromatographie. Demgegenüber klas-
sifizierten Kedinger et al. (1970) die RNA Polymerasen
aus Kalbsthymus als A und B nach unterschiedlicher
Sensibilität gegenüber α -Amanitin, einem Gift des
Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Dieser spezifi-
sche Inhibitor hemmt das B Enzym bei geringer Dosierung
(etwa 10^{-8} - 10^{-9} M) und wird daher als wichtiges Dif-
ferenzierungsmerkmal bei der Charakterisierung und
Klassifizierung der Polymerasen verwendet.

Die Polymerasen zeigen innerhalb der eukaryonten Zelle
eine gewisse Kompartimentierung. Das amanitinresistente
A Enzym kommt vorwiegend im Nucleolus vor (Roeder und
Rutter, 1970), während das B Enzym im Kernplasma loka-
lisiert ist (ausführliche Übersicht, Benecke, 1973).
Eine zunächst im Zytoplasma der Rattenleber nachgewiesene
RNA Polymerase wurde von Seifart et al. (1972) be-
schrieben und als RNA Polymerase C bezeichnet. Später
wurde im Zytoplasma aus Thymus- und Ascites-Zellen
(Amalric et al., 1972) ein ähnliches Enzym gefunden.

Dieses Enzym C besitzt gegenüber α -Amanitin eine Sensibilität, welche zwischen derjenigen der Enzyme A und B liegt (Seifart et al., 1972). Inzwischen ist das C-Enzym auch in anderen Geweben nachgewiesen worden (Amalric et al., 1972; Wilhelm et al., 1974; Weinmann und Roeder, 1974 a) und gilt als integraler Bestandteil jeder eukaryonten Zelle (Seifart und Benecke, 1975).

Die RNA Polymerasen A, B und C (oder I, II, und III) zeigen die Fähigkeit, in Zellkernen verschiedene Gene bzw. Genklassen selektiv zu transkribieren (ausführliche Übersicht, Udvardy und Seifart, 1976; Weinmann und Roeder, 1974 a). Die Polymerase A transkribiert die Gene des 45S ribosomalen Vorläufers, welcher die Sequenzen der 18S und 28S rRNA enthält. Das Enzym B kopiert sehr wahrscheinlich diejenigen DNA-Sequenzen, welche die Information zur Synthese von Proteinen enthält. Im Gegensatz zu den beiden anderen Polymerasen transkribiert Polymerase C die Gene für prä-tRNA- und ribosomale 5S RNA. In virusinfizierten Zellen sind die Wirtsenzyme an der Transkription der viralen Gene beteiligt. In menschlichen Zellen (Zellkultur) wird 18 Stunden nach Infektion mit Adenoviren-2 durch das zelluläre B-Enzym ein großer Teil des viralen Genoms transkribiert (Weinmann et al., 1974 b), und

das zelluläre C-Enzym ist für die Synthese der viralen 5,5S RNA sowie der zellulären 5S und 4S RNA verantwortlich (Weinmann et al., 1974 b; Weinmann et al., 1976).

Die Polymerase A hingegen zeigt nach Infektion keine Aktivität, ist also an der Transkription des viralen Genoms nicht beteiligt (Weinmann et al., 1974 b).

Untersuchungen der Syntheseprodukte des C-Enzyms in isolierten Kernen haben gezeigt, daß die Polymerase C im in vitro-System korrekt initiiert und terminiert (Weinmann et al., 1974 c; Marzluff et al., 1974; Price und Penmann, 1972; Udvardy und Seifart, 1976), und die zukünftigen Bestrebungen werden sich daher konzentrieren auf Untersuchungen in Systemen, die durch Rekonstitution gereinigter Komponenten zustande kommen.

Es bestehen zur Zeit zwei Nomenklatorsysteme, welche parallel gebraucht werden und welche die Polymerasen der eukaryonten Zellen als A (bzw. I), B (bzw. II), und C (bzw. III) bezeichnen. Innerhalb dieser Hauptklassen ist eine Mikroheterogenität nachgewiesen worden.

Bei den Klassen A (Chesterton und Butterworth, 1971a, b; Smukler und Tata, 1971; Froener und Bonner, 1973; Roeder, 1974a; Philips und Forest, 1973; Coupar und Chesterton, 1975) und C (Schwartz et al., 1974; Weinmann und Roeder, 1974a, c) beruht diese Heterogenität auf der variablen Präsenz kleiner Untereinheiten des

Enzyms, während die Unterklassen des B-Enzyms (Chesterton und Butterworth, 1971; Kedinger et al., 1971, 1974) wahrscheinlich auf die Modifikation einer oder mehrerer der großen Untereinheiten zurückzuführen ist (Kedinger et al., 1974; Sudgen et al., 1973; Krebs und Chambon, 1976).

Die physiologische Bedeutung der Mikroheterogenität innerhalb der Hauptklassen der RNA Polymerasen ist nicht geklärt. Bisherige Untersuchungen an den multiplen Formen der RNA Polymerase C zeigen unterschiedliche Eigenschaften in der Elution nach DEAE-Sephadex Chromatographie, aber die gleiche Sensibilität gegenüber α -Amanitin (50% Hemmung bei 10-30 μ g/ml).

Schwartz und Mitarbeiter (1974) untersuchten zwei Formen der RNA-Polymerase III hinsichtlich deren Zelllokalisation bei Maus Myeloma Zellen. Die Ergebnisse zeigten, daß das Enzym III_A im Kern lokalisiert ist, während III_B im Zytoplasma gefunden wurde. Im Gegensatz zu diesen Resultaten fanden Weil und Blatti (1976) in HeLa-Zellen beide Formen des Enzyms (III_A und III_B) im Zellkern.

Zu Beginn dieser Arbeit lag allein die Untersuchung

von Benecke über eine gewisse Heterogenität der Polymerase C im Zytoplasma der Rattenleber vor. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die RNA Polymerase C aus dem Zytoplasma von Rattenleberzellen auf eine mögliche Mikroheterogenität zu untersuchen, sowie deren strukturelle und funktionelle Bedeutung für die Transkription zu studieren.

In dieser Arbeit wird die Isolierung und partielle Charakterisierung von zwei neuen C-Enzymen, CI und CII, die durch DEAE-Sephadex A-25 Chromatographie und Elution mit NH_4Cl isoliert wurden, beschrieben. Darüber hinaus wurde gefunden, daß sich diese Enzyme durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Elution von einer DEAE-Sephadex A-25 Säule in fünf bisher nicht beschriebene Komponenten CI-a, CI-b, CI-c, CII-a, und CII-b trennen lassen. Diese Komponenten wurden isoliert und der Versuch unternommen, sie zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.2. Material

Ausgangsmaterial für die Isolierung der Enzyme war das Zytoplasma von Leberzellen von 120g bis 200g schweren männlichen Wistar BRLI Ratten, die von der Tierzüchterei Brünger (Halle/Westf.) bezogen wurden. (^3H)-UTP (1-5Ci/mMol) wurde von The Radiochemical Center (Amersham) bezogen; Nucleosidtriphosphate, Kreatinphosphat und Kreatinphokinase von Boehringer (Mannheim); DEAE-(DE 32, 1meq/g) und Phosphozellulose (p 11,7 meq/g); Ionenaustauscher von Whatmen (London); DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-25 coarse von Pharmacia (Uppsala) und Kalbsthymus DNA von Calbiochem (Los Angeles). Die Substanzen für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden von Serva (Heidelberg) erhalten; Agarose von den Behringwerken (Marburg); α -Amanitin von Boehringer (Mannheim). Alle anderen Chemikalien waren p.a. Substanzen der Firma Merck (Darmstadt).

Puffer:

Puffer 1 (Polymerase Puffer): 0.05 M TRIS-HCl, pH 7.9

0.25 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoäthanol, 20%

Glyzerin

Puffer 2 (TSS-Puffer): isotonischer Saccharose Puffer;

0.05 TRIS-HCl, pH 7.5; 0.25 M Saccharose;
0.01 M $MgCl_2$; 0.025 M KCl

2.2. Methoden

2.2.1. Präparation von Zytoplasmaextrakt

Zur Entnahme der Leber wurden die Ratten durch zervikale Dislokation getötet. Die Eingeweide wurden freieroperiert, die Leber mit 10 ml eiskaltem TSS-Puffer (Puffer 2) durchspült und entnommen. Die Lebern wurden zunächst grob zerkleinert und dann im "Potter" homogenisiert (jeweils etwa 10 gr Leber in 30 ml Puffer 2). Das Leberhomogenat wurde entsprechend dem Schema der Abbildung 1 weiter aufgearbeitet. Durch zweimalige Zentrifugation in einer Sorvall-Zentrifuge für 10 min. bei 1000g, bzw. 30 min. bei 48.000 g, wurden zunächst die Zellkerne und dann die Mitochondrien vom Zytoplasma abgetrennt. Zur Sedimentation der ribosomalen und lysosomalen Zellbestandteile war eine einmalige Ultrazentrifugation für 4 Stunden bei 140.000 g in einen SW27 Rotor erforderlich. Nach Absaugen einer flottierten Lipidschicht wurde der Überstand dekantiert und mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 50%) zur Stabilisierung der Substanz, welche dann bei $-60^{\circ}C$ eingefroren wurde. Alternativ wurde der Überstand sofort weiter-

verarbeitet und mit Puffer 1, pH 8.5 auf pH 7.9 titriert, wonach das zytoplasmatische Ausgangsmaterial für die weitere Isolierung und Reinigung der Polymerase C vorbereitet war. Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Extraktions- und Isolierungsverfahren bei 2-4°C durchgeführt.

2.2.2. Aktivitätsmessung der RNA Polymerase

Zur Probe (110 µl Aliquot) wurde folgender Testansatz (40 µl) zugegeben: Jeweils 0.2 µMol ATP, GTP und CTP; 0.002 µMol UTP; 1.0 µCi (³H)-UTP; 1.5 µMol Kreatinphosphat; 5 µg Kreatinphosphokinase; 1.5 µMol β-Mercaptoäthanol; 10 µMol TRIS-HCl, pH 7.9; 20 µg DNA; 0.5 µMol MnSO₄, und wo zutreffend, 5 µl der entsprechenden Amanitinlösung. Vom resultierenden Endvolumen von 150 µl wurde nach 60 Min. Inkubationszeit bei 37°C ein Aliquot von 120 µl entnommen, auf ein Filterplättchen (≈16 cm², 2043 b der Firma Schleicher und Schuell) pipettiert und in 5%-iger eiskalter Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen mit eiskalter TCA (5%) wurden die Filterplättchen 2x mit Methanol: Aceton (1:1) und 1x mit Äther gewaschen (Seifart et al., 1972). Nach Lufttrocknung wurde der Einbau des markierten Nucleotids in einem Flüssigkeitszintillationssystem (5g PPO und 200mg POPOP in 1L Toluol) radiochemisch gemessen (Nuclear

Chicago Mark I). Enzymaktivität wurde in counts/min $\times 10^{-3}$ ausgedrückt.

2.2.3. Säulenchromatographie

Die Austauscher-Cellulosen (DEAE- und Phosphocellulose) wurde vor Gebrauch mit 0.5 N HCl und 0.5 N NaOH regeneriert und mit Aqua-Bidest gewaschen. Anschließend wurde der Ionenaustauscher mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert. Das Packen der Säule erfolgte in einem Arbeitsgang. DEAE-Sephadex wurde zunächst mit 2 M NH_4Cl bzw. 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dann mit 0.1 M NaOH behandelt und danach mit 0.5 M NH_4Cl bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gewaschen. Zwischen jedem Schritt wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und zum Schluß mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert. Vor dem Packen der Säulen wurden Luftblasen durch Absaugen bei Zimmertemperatur aus der Gelmatrix entfernt. Die Proteine wurden bei den verschiedenen chromatographischen Trennverfahren durch lineare Salzgradienten eluiert. Der Verlauf der Gradienten wurde durch Titration mit 0.01 N AgNO_3 , und K_2CrO_4 als Indikator (bei NH_4Cl -Elution) bzw. durch Leitfähigkeitsmessung (bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Elution) bestimmt.

2.2.4. Dichtegradientenzentrifugation

Lineare Dichtegradienten wurden mit 15%- und 45%-igem

Glyzerin in Puffer 1 hergestellt, und nach Probenauftrag 18 Stunden bei 250.000 g zentrifugiert. Nach Ablauf der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit des Röhrchens durch eine Kapillare mit einer Pumpe vom Boden aus abgesaugt und in 30 Fraktionen gesammelt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951) mit Serumalbumin (von Merck) als Standard.

2.2.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS

Analytische Gelelektrophoresen wurden nach der Methode von Weber und Osborn (1969) durchgeführt. Die Proben wurden mit 10% SDS und β -Mercaptoäthanol für 10 min. bei 100°C inkubiert. Das denaturierte Protein wurde auf 5% SDS-haltige Gele mit den Abmessungen 6x65 mm aufgetragen und für 1 Stunde mit 1.5 mA/gel vorelektrophoresiert; danach für 6 Stunden mit 6 mA/Gel in 0.1 M Natriumphosphatpuffer-SDA (1%), pH 7.1 nachelektrophoresiert. Nach der Entnahme wurden die Gele 2 Stunden in 0.25% Coomasie Brilliantblau, 40% Methanol und 7.5% Essigsäure gefärbt. Die Entfärbung wurde mit 20% Methanol und 7.5% Essigsäure durchgeführt und dauerte bis zu 2 Tagen.

Eine densitometrische Auswertung der Gele erfolgte im Gilford registrierenden Spektralphotometer bei 640 nm.

3. Ergebnisse

3.1. Reinigung der Polymerase C

Das präparierte Zytoplasma wurde mit Puffer 1 so verdünnt, daß die Leitfähigkeit unter 6 mS lag (zum Vergleich: Puffer 1 zeigt den Wert 4 mS). Auf dieser Stufe der Extraktion beträgt die ermittelte Proteinkonzentration des Überstands aus 40 Rattenlebern (Auftragsvolumen auf DEAE-Cellulose c.a. 890 ml) 4.6 mg/ml und die dazugehörige Enzymaktivität 580 cpm unter den angegebenen Testbedingungen. Nach Beladung der DEAE-Cellulose Säule bei einer Flußrate von 90 ml/Std. wurde die Säule mit einem Liter Puffer 1 nachgewaschen und anschließend an einen Salzgradienten angeschlossen (Abb.2). Die Enzymaktivität zeigt einen einheitlichen Gipfel, der bei 0.22 M NH_4Cl eluiert wird. Die Fraktionen, welche Enzymaktivität enthielten (von 0.14 bis 0.34 M NH_4Cl) wurden gesammelt, mit Ammoniumsulfat (4gr/10 ml) gefällt und zentrifugiert (s. Schema Abb. 1). Das so gewonnene Sediment wurde in Puffer 1 aufgenommen und durch eine G-25 (coarse) Säule entsalzt. Diese Substanz (Leitfähigkeit: 11.50 mS) wurde ohne Pumpendruck auf eine Phosphocellulose-Säule aufgetragen und danach mit Puffer 1 (400 ml) gewaschen, bis das UV-Profil keine Absorption mehr zeigte.

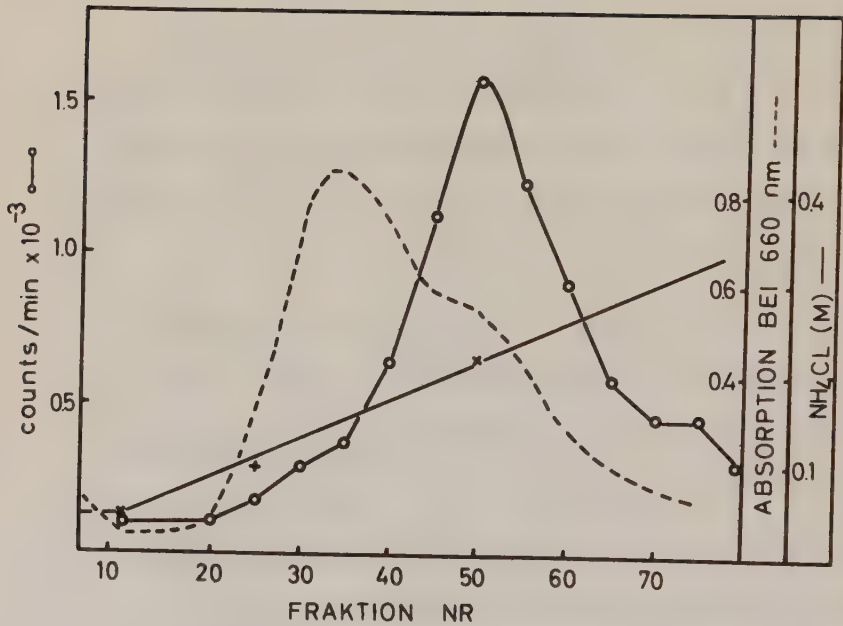


Abb. 2 DEAE-Cell. Chromatographie des Zytoplasmas auf einer 20x4 cm Säule. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten zwischen 0.1 M bis 0.45 M NH_4Cl in Puffer 1 (800+800 ml).

Die Elution der Phosphocellulose Säule wurde in einer einzigen Stufe mit 0.5 M NH_4Cl in Puffer 1 durchgeführt. Sobald das UV-Profil des Eluates anzusteigen begann, wurde die Pumpe ausgeschaltet. Die Säule wurde eine Stunde in der Gegenwart von Salz belassen, und das Protein danach in einer Stufe eluiert. Die Fraktionen wurden nach UV-Absorptionsprofil gesammelt. Normalerweise betrug das Volumen der vereinigten Fraktionen 100 ml mit einem Proteingehalt von 0.812 mg/ml und einer Enzymaktivität von 2.300 cpm. Nach Entsalzung durch Sephadex G-25 oder Dialyse (5 Std.) enthielt das Material 0.1 M NH_4Cl (ermittelt durch Titration). Dieses wurde mit einer Flußrate von 30 ml/Std. auf eine DEAE-Sephadex-Säule aufgetragen, gewaschen bis das UV-Profil abnahm und mit einem NH_4Cl -Gradient bei einer Flußgeschwindigkeit von 50 ml/Std. eluiert (Fraktionsgröße: 8 ml). Die Fraktionen, welche Enzymaktivität enthielten, wurden vereinigt. Die Proteine wurden daraufhin durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (4gr/10 ml) und anschließender Zentrifugation (140.000 g, SW 27 Rotor, 30 Min.) sedimentiert, und in Puffer 1 resuspendiert.

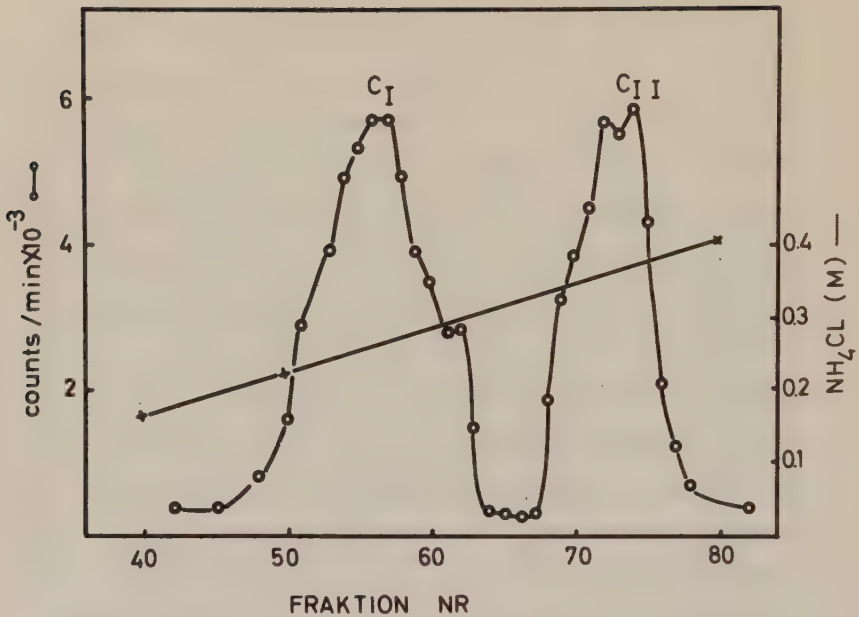


Abb. 3 Isolierung der RNA Polymerase CI und CII nach DEAE-Sephadex Chromatographie. Die Säule (2.5x24 cm) wurde mit einer Flußrate von 30 ml/Std. mit der Proteinklösung beladen. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten zwischen 0.0 M (400 ml Puffer 1) und 0.55 M NH₄Cl (400 ml in Puffer 1). 8 ml Fraktionen wurden gesammelt.

Die Polymerase C spaltete sich dabei in zwei Subkomponenten auf (Abb.3), die bei 0.26 M NH_4Cl bzw. 0.37 M NH_4Cl eluierten. Die aktiven Fraktionen der Gipfel 1 und 2, als CI und CII benannt, wurden getrennt vereinigt und mit Ammoniumsulfat (4 gr/10 ml) gefällt. Die entsprechenden Sedimente wurden entweder in 50% Glyzerin aufgenommen und zur Stabilisierung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt oder in Puffer 1 mit 10%-igen Glyzerin suspendiert, wenn das Enzym sofort weiter verarbeitet wurde.

3.2. Charakterisierung der Polymerase CI und CII

3.2.1. Dichtegradientenzentrifugation

Die beiden Komponenten des C Enzyms wurden durch Dichtegradientenzentrifugation auf ihr Molekulargewicht untersucht. Die Polymerase CI bzw. CII wurden in Puffer 1 mit 10% Glyzerin gelöst und 11/2 Stunden gegen denselben Puffer dialysiert, um überschüssiges $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu entfernen. Diese Substanz wurde in 0.9 ml Portionen auf Glyzeringradienten zentrifugiert und gesammelt wie unter Methoden beschrieben (Abb. 4). Die Fraktionen, welche Aktivität zeigten, wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat (3.3 gr/10 ml) gefällt. Beide Sedimente wurden entweder in Puffer 1 mit 50% Glyzerin zur Stabilisierung in flüssigen Stickstoff oder in Puffer 1 mit 20% Glyzerin zur weiteren Untersuchung aufgenommen.

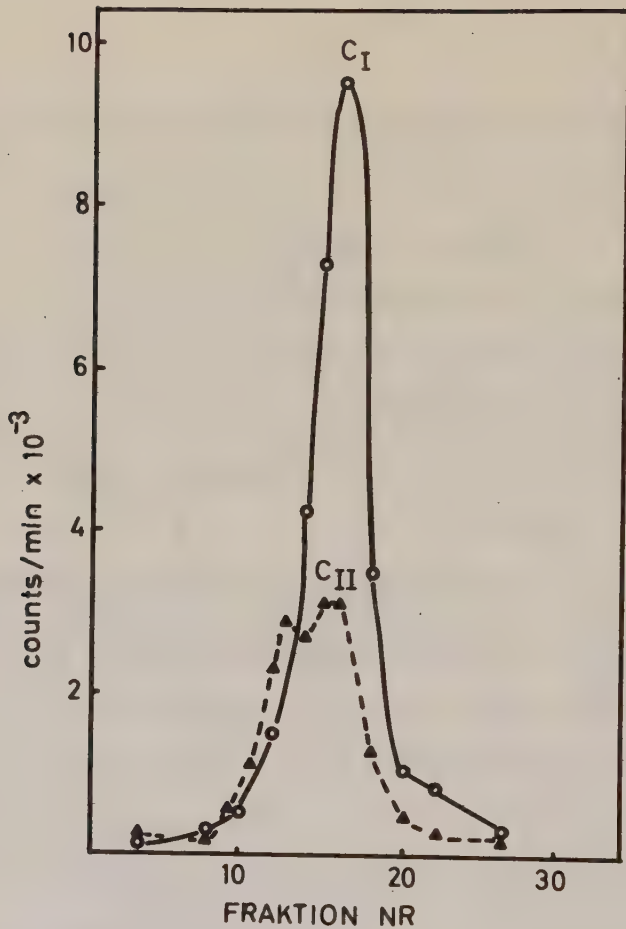


Abb. 4 Dichtegradientenzentrifugation der Enzyme CI und CII. Zentrifugationsbedingungen: 18 Std. Laufzeit, 38.000 rpm, Rotor SW 41; lineare Gradienten von 15% auf 45%-igen Glyzerin in Puffer 1 mit 0.08 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration. 30 Fraktionen wurden gesammelt.

Im Gegensatz zur Polymerase CI zeigt die Polymerase CII keinen einheitlichen Enzymgipfel unter den angegebenen Bedingungen.

3.2.2. Hemmung durch α -Amanitin

Zur Differenzierung der Enzymkomponenten CI und CII wurde ein Funktionstest mit α -Amanitin durchgeführt (Abb.5). Die Enzymaktivität der Polymerase CI nach Dichtegradientenzentrifugation ist bei einer α -Amanitinkonzentration von 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 40% gehemmt, während für CII über 10.0 $\mu\text{g Amanitin/ml}$ notwendig sind, um die gleiche Hemmung zu erzielen. Die Polymerase B der Ratteuleber wurde zum Vergleich parallel dazu untersucht (gleiche Reinigungsstufe wie die C-Komponenten; d.h. DEAE-Cellulose, Phospho-Cellulose, DEAE-Sephadex, und Dichtegradientenzentrifugation). Dabei zeigt sich, daß das Enzym B bei 0.005 $\mu\text{g Amanitin/ml}$ zu 50% inhibiert ist und bei 0.05 $\mu\text{g Amanitin/ml}$ eine fast totale Hemmung aufweist. Demgegenüber ist CI erst bei 100 mg und CII bei 120 mg/ml völlig gehemmt.

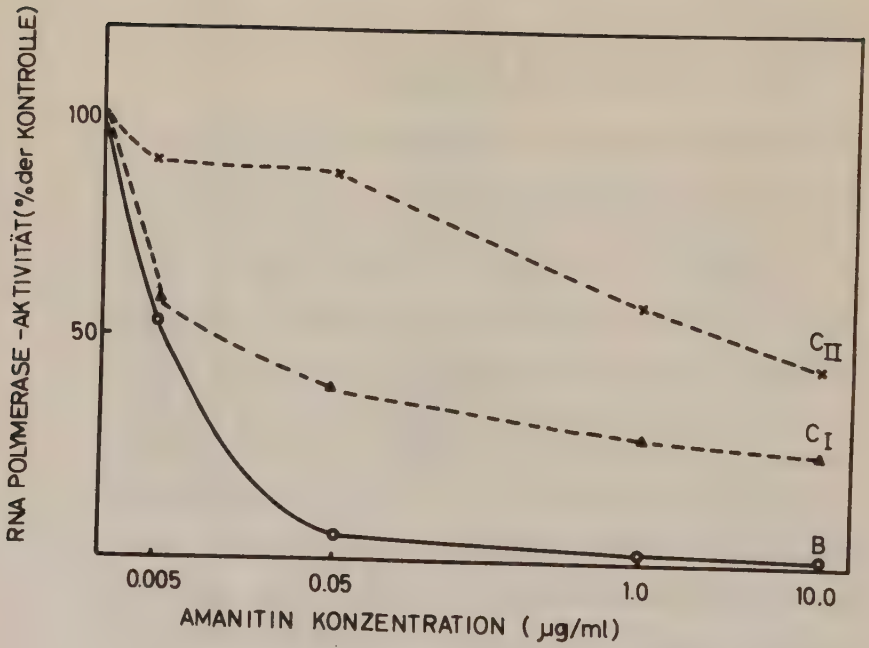


Abb. 5 Hemmung der Polymerasen CI und CII mit α -Amanitin. Effekt steigender Amanitinkonzentrationen auf die Aktivität der Polymerasen CI, CII und B.

3.2.3. Untersuchung zur Aggregation der Polymerase CII

3.2.4. Dichtegradientenzentrifugation bei unterschiedlicher Salzkonzentration

Wie unter Abschnitt 3.2.1. gezeigt worden war, zeigte die Polymerase CII nach Dichtegradientenzentrifugation in 0.08 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine ausgeprägte Tendenz zur Aggregation (s. Abb.4). Um zu klären, ob dieses Phenomen Salzkonzentrationsabhängig ist, wurde die Ammoniumsulfatkonzentration des Glyzeringradienten in einem ansteigenden Gefälle geändert. Das Enzym wurde auf getrennte Glyzeringradienten unterschiedlicher Ionenstärke aufgetragen und parallel zentrifugiert. Das Resultat dieses Experiments ist in Abb.6 dargestellt und zeigt, daß die maximale Enzymaktivität bei 0.16 M erreicht wurde, daß aber lediglich bei 0.25 M der Aktivitätspeak symmetrisch verlief.

Es war weiterhin erforderlich, zu untersuchen, ob die Aggregation auf einer Komplexierung mit endogener Nukleinsäure zurückzuführen ist, die entweder an das Enzym gebunden ist oder während des Reinigungsverfahrens mit diesem co-chromatographiert. Deshalb wurde die Polymerase CII vor der Dichtegradientenzentrifugation

mit DNase behandelt und auf Glyzeringradienten (0.08 M Ammoniumsulfat) zentrifugiert. Dabei wurde das zweigipfelige Profil der Polymerase CII beseitigt, während die unbehandelte Probe das typische Verhalten nach Gradientenzentrifugation zeigte. Nach diesem Versuch war es wichtig zu untersuchen, ob die nach DEAE-Sephadex Chromatographie beobachtete (s. Abb.3) Mikroheterogenität dieses Enzyms auf unterschiedliche Verunreinigung mit Nukleinsäure, welche ein unterschiedliches Elutionsverhalten bedingen könnte, zurückzuführen ist. Daher wurden die Polymerasen CI und CII auf DEAE-Cellulose und Phospho-Cellulose vorgereinigt und mit DNase behandelt. Die CII-Lösung enthielt 0.5 mM MgCl₂; 0.08 M (NH₄)₂SO₄; und 2 µg DNase/Ansatz. Die Inkubation erfolgte für 30 Min. bei 2°C, unter Rühren. Die behandelte bzw. unbehandelte Probe wurde auf getrennten DEAE-Sephadex Säulen parallel rechromatographiert. Das Elutionsverhalten beider Proben war identisch; daraus ist zu schließen, daß die unterschiedlichen chromatographischen Eigenschaften der Enzyme CI und CII auf DEAE-Sephadex A-25 nicht auf eine Komplexbildung mit Nukleinsäure zurückzuführen ist.

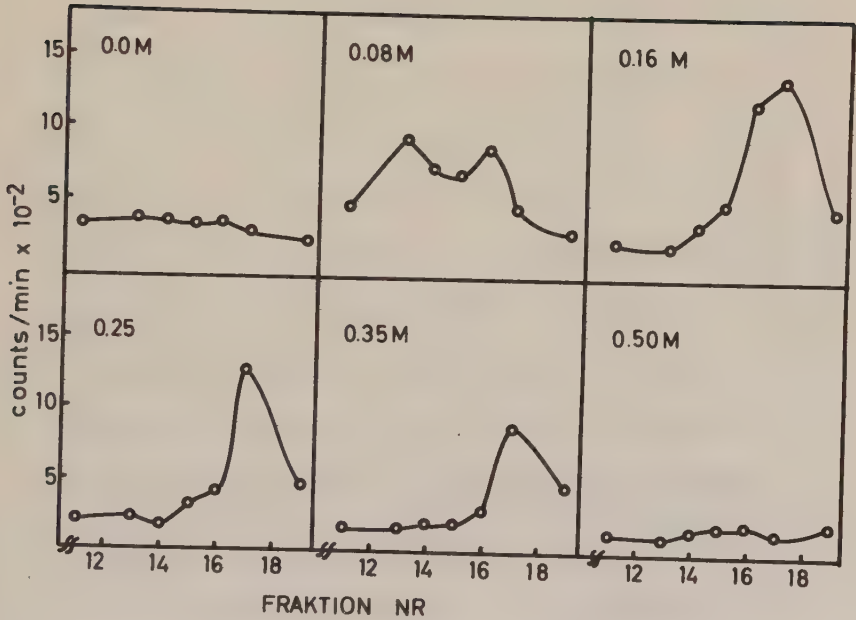


Abb.6 Dichtegradientenzentrifugation der Polymerase CII bei unterschiedlicher Ionenstärke. Die übrigen Bedingungen waren die gleichen wie bei Abb.4.

3.2.5. Chromatographische Eigenschaften der Polymerasen CI und Polymerase B

Die Untersuchungen zur Hemmbarkeit mit α -Amanitin (S. Abb.5) zeigten, daß Polymerase CI ein z.T. ähnliches Verhalten wie das Enzym B aus Rattenleber gegenüber niedrigen Amanitinkonzentrationen aufweist. Bei höherer Amanitinkonzentration weicht dieser Verlauf jedoch stark von dem des B-Enzyms ab. Um die Frage einer möglichen Kontamination zwischen den Enzymen CI und B während des Aufschlußverfahrens der Zellen zu klären, wurde ein direkter Vergleich der Elutionspunkte beider Polymerasen auf DEAE-Sephadex durchgeführt (Abb.7). Die Enzyme B und CI wurden nach getrennter Isolierung (DEAE-Sephadex Chromatographie) gemischt, auf eine DEAE-Sephadex-Säule (2.5x24 cm) aufgetragen und mit NH_4Cl eluiert. Wie Abb.7 zeigt, wurden die Enzyme CI und B deutlich getrennt bei Salzkonzentrationen von 0.29 M bzw. 0.35 M NH_4Cl eluiert. Dieses entspricht den typischen Elutionspunkten beider Enzyme.

3.2.6. Hemmung der Polymerasen CI und B durch α -Amanitin nach DEAE-Sephadex Chromatographie

Da für eine Aussage über die Identität der beiden Enzyme

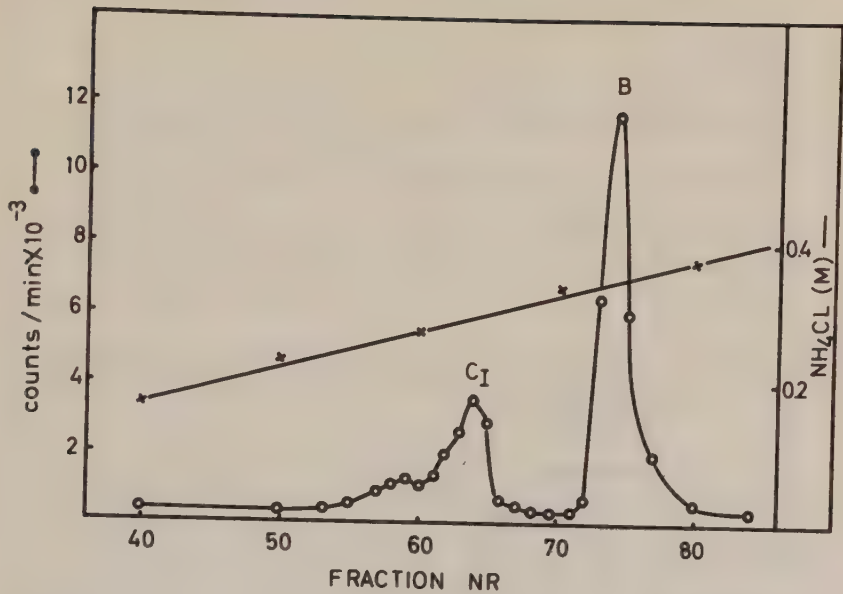


Abb.7 DEAE-Sephadex A-25 Chromatographie einer Mischung von vorgereinigter RNA Polymerase CI und B. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Gradienten (350 + 350 ml; 0.0 bis 0.55 M NH_4Cl in Puffer 1). Flußrate: 35 ml/Std., Fraktionen zu 5.8 ml wurden gesammelt.

aus Abb.7 ein Differenzialtest notwendig war, wurden die beiden Polymerasen in Gegenwart steigender α -Amanitinkonzentration untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß sowohl die Polymerase B (50%-Inhibition bei 0.008 μ g Amanitin/ml) als auch CI (0.02 μ g Amanitin/ml) das typische inhibitorische Verhalten gegenüber α -Amanitin aufweisen. Das Enzym B wurde bei 0.05 μ g Amanitin/ml fast total gehemmt, während für Polymerase CI die gleiche Inhibition erst bei 100 μ g Amanitin/ml erreicht wurde.

3.3. Gewinnung der Enzyme CI-a, CI-b, CI-c; CII-a und CII-b.

Da die vorangegangenen Versuche ergeben hatten, daß es sich bei den Enzymen CI und CII um getrennte Molekülpopulationen handelt, wurden weitere chromatographische Trennungsmöglichkeiten untersucht, um die Heterogenität der RNA Polymerase C zu erhärten. Dabei stellte sich heraus, daß sich die Polymerase C durch geeignete Bedingungen nach Chromatographie auf DEAE-Sephadex und Elution mit Ammoniumsulfat in fünf Komponenten trennen läßt (Abb.8). Die einzelnen C-Komponenten wurden in der Reihenfolge ihrer Elution von der DEAE-Sephadex-Säule benannt, welche bei 32, 40, 48, 62 und 68 mS erfolgte. Außerdem wurden die Untergruppen des C-Enzyms nach

ihrer Empfindlichkeit gegenüber α -Amanitin (s. Abb.9, des folgenden Abschnitt 3.3.2.) in zwei Gruppen eingeteilt: CI-a, CI-b, und CI-c (empfindlicher); und CII-a und CII-b (weniger empfindlich).

3.3.1. Charakterisierung der fünf C-Komponenten

3.3.2. Hemmung durch α -Amanitin

Das Verhalten der nach Abb.8 in verschiedenen Aktivitätsgipfel eluierten Polymerase-Präparate gegenüber dem spezifischen Inhibitor α -Amanitin wurde untersucht. Die Abb.9 zeigt, daß die Komponenten CI-a, CI-b, und CI-c etwa die gleiche Sensibilität gegenüber dem Gift des Knollenblätterpilzes haben, während CII-a und CII-b eine zweite Gruppe bilden. Auffallend im Vergleich zu dem vorher beschriebenen Versuch (s. Abb.5) ist die hohe Empfindlichkeit der Polymerasen CI-a, CI-b und CI-c gegenüber dem Amanitin. Bei einer Amanitinkonzentration von 0.05 $\mu\text{g/ml}$ zeigten die CI-Enzyme eine Aktivität von 7-20%. Zum Vergleich wurde Polymerase B bei dieser Amanitinmenge fast total gehemmt (Abb.9). Für CII-a und CII-b wurden 10 $\mu\text{g Amanitin/ml}$ benötigt, um eine Hemmung bis zur Restaktivität von 40% bzw. 68% zu erreichen.

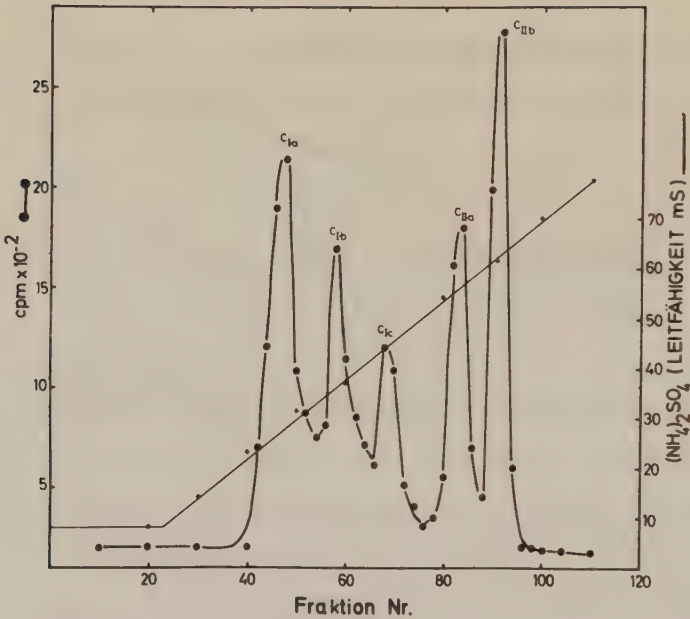


Abb.8 Chromatographie der Polymerase C an einer (2.5x24 cm) DEAE-Sephadex A-25 Säule, welche mit einem linearen Salzgradienten von 0.05 auf 0.55 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (350+350 ml in Puffer 1) eluiert. Die Proteinlösung nach Phosphocellulose (40-80 ml, 10-12 mS) wurde gegen Puffer 1 (mit 0.05 M Sulfat) dialysiert und anschließend auf DEAE-Sephadex A-25 aufgetragen (s. Methoden). Flußrate: 35 ml/Std. Fraktionen zu 6-7 ml wurden gesammelt.

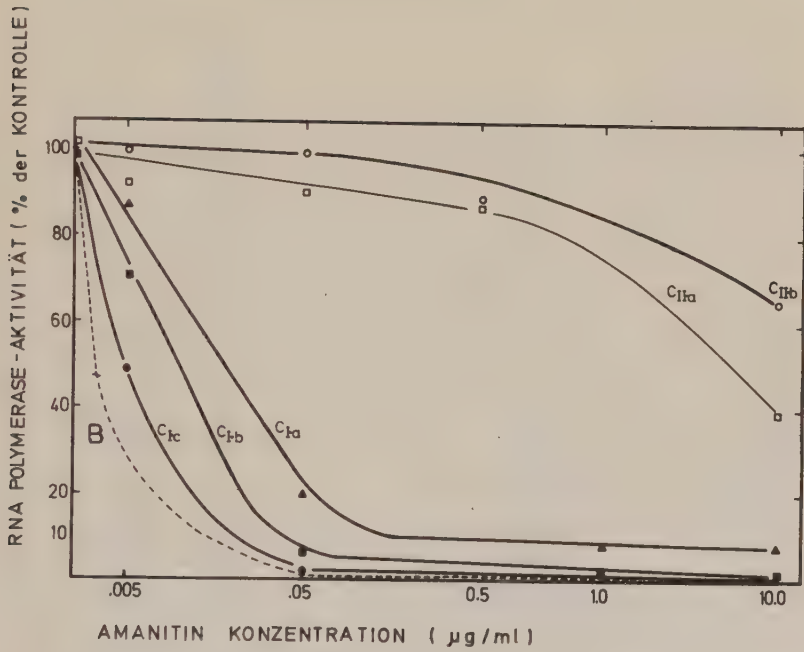


Abb.9 Funktionstest der verschiedenen Polymerase C-Komponenten nach DEAE-Sephadex (Sulfat-Gradient). Polymerase B (der gleichen Reinigungstufe) wurde als Marker verwendet.

3.3.3. Dichtegradientenzentrifugation

Die fünf C-Komponenten wurden durch Glyzeringradientenzentrifugation auf ihr Molekulargewicht untersucht. Die Versuchsbedingungen wurden wie in Abschnitt 3.2.1. und Abb.4 durchgeführt. Im Einklang mit dem Aggregationsphänomen der Polymerase CII auf Glyzeringradienten (s. Abb.4) zeigt sich, daß sowohl Polymerase CII-a als auch CII-b nach Gradientenzentrifugation zur Aggregation neigen (Abb.10). Unter den gleichen Bedingungen zeigten die Polymerase CI-a, CI-b und CI-c einen einheitlichen Enzymgipfel, wie im Falle der Polymerase CI (s. Abb.4) zu beobachten war.

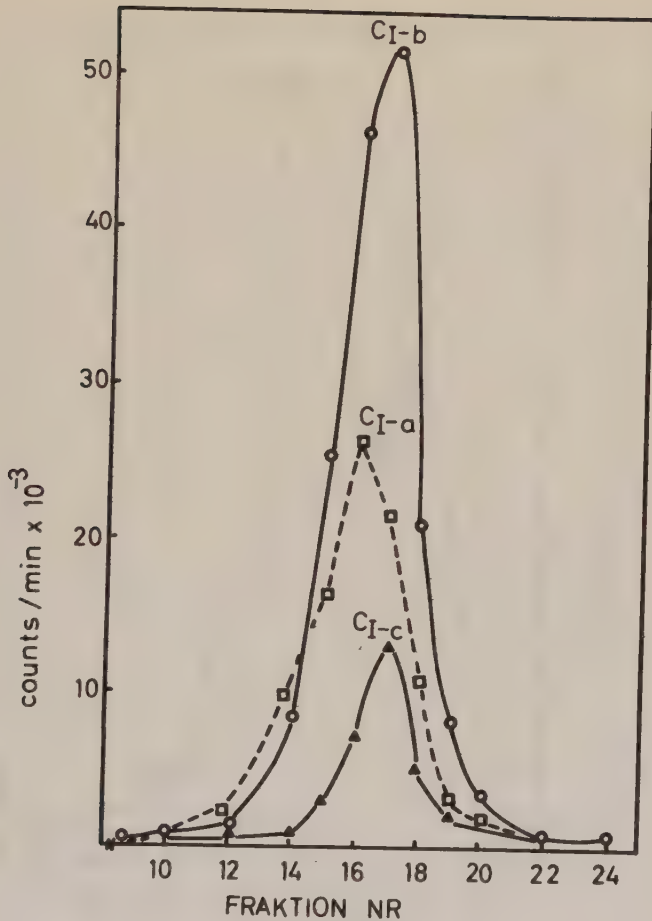


Abb. 10a Dichtegradientenzentrifugation der Enzyme CI-a, CI-b, und CI-c in 0.08 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Zentrifugationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb.4. Die Enzyme wurden nach dem unter Methoden beschriebenen Schema isoliert.

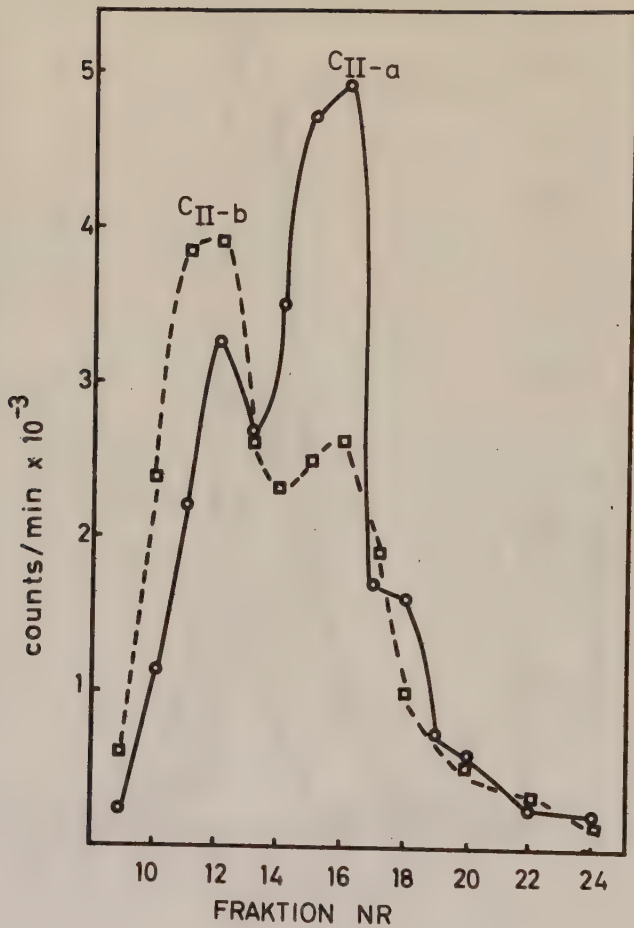


Abb. 10b Dichtegradientenzentrifugation der Enzyme CII-a und CII-b in 0.08 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Zentrifugationsbedingungen waren die gleichen wie in Abb.4 und in Abb.10a.

3.3.4. Matrizenabhängigkeit

Die Enzyme CI und CII bzw. deren Sub-Komponenten wurden auf ihre Fähigkeit, native DNA-Matrizen zu transkribieren untersucht. Dazu wurde native DNA aus Vaccinia-Virus und Adenovirus Typ 2 sowie native oder denaturierte DNA aus Thymus benutzt. Als Marker wurde eine vergleichbare Reinigungsstufe des Enzyms B aus Rattenleber benutzt. Die Enzyme wurden entsprechend dem unter Methoden beschriebenen Standardansatz auf ihre Aktivität untersucht. Die Abbildung 11a zeigt, daß das Enzym B native DNA (Thymus) erwartungsgemäß wesentlich schlechter transkribiert (2×10^3 gegenüber 8.5×10^3) als denaturierte DNA (Seifart et al., 1973). Demgegenüber transkribieren alle Polymerasen C die native DNA aus Thymus mit etwa der gleichen Effizienz wie denaturierte DNA. Weiterhin wurden die C-Enzyme auf ihre Präferenz gegenüber der viralen DNA untersucht. Wie Abbildung 11b zeigt, sind CI und CII in der Lage, native DNA aus Vaccinia Virus zu transkribieren (CI: 74% Effizienz; CII: 40% Effizienz). Im Vergleich zu CI und CII transkribiert das B-Enzym die Vaccinia Virus DNA nur mit 41% der Effizienz der denaturierten (Σ) -Thymus-DNA. DNA aus Adenovirus (Ad-2-Typ wird unter den Bedingungen dieses Versuches von dem B-Enzym nicht transkribiert, während

CI 18.5% und CII 8.3% der Aktivität gegenüber nativer Thymus-DNA aufweist.

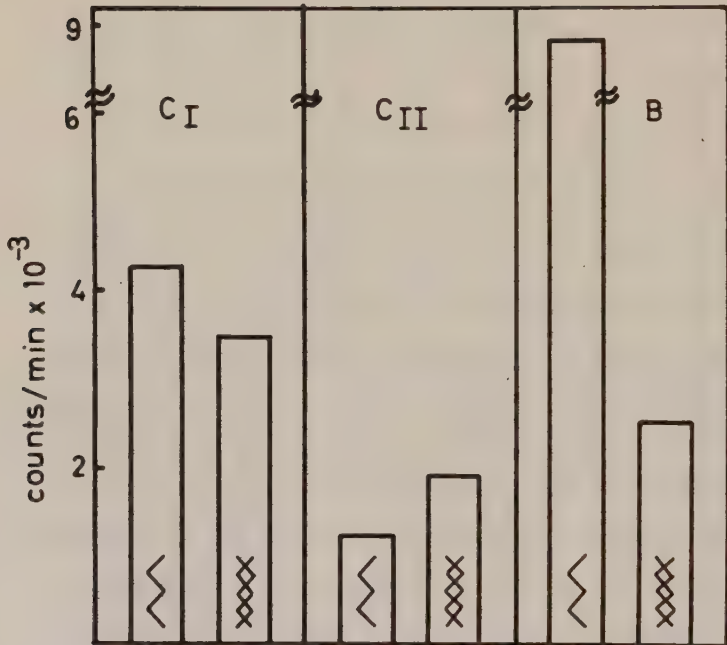


Abb. 11a Matrizenabhängigkeit der heterogenen Komponenten des C-Enzyms nach Zugabe von denaturierter ($\sim$)- bzw. nativer ($\times$)-DNA aus Kalbsthymus. Enzym B aus Rattenleber wurde als Marker benutzt. Die Aktivität wurde in cpm $\times 10^{-3}$ ausgedrückt.

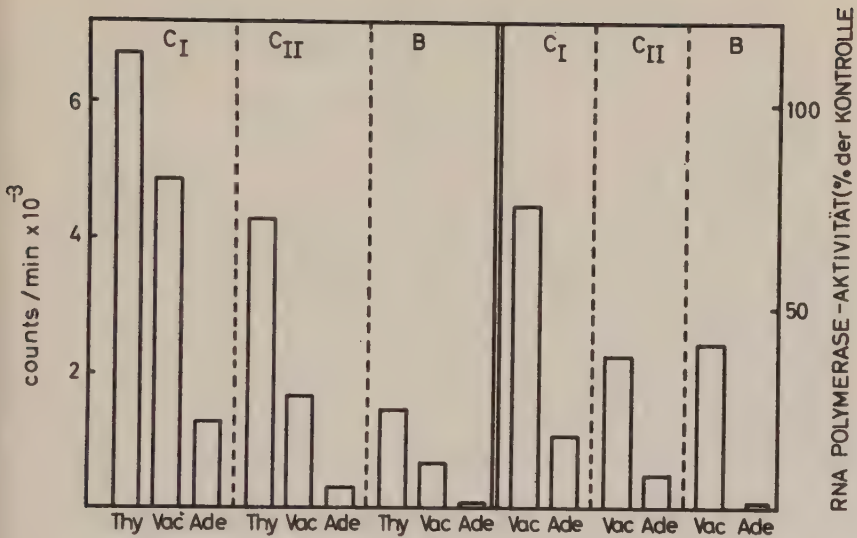


Abb.11b Enzymaktivität der Polymerase CI, CII und B bei der Transkription viraler und Thymus DNA (als Kontrolle). (Links) Transkription nativer (X)-DNA aus Vaccinia Virus und Adenovirus-2. Zum Vergleich, native (X)-DNA aus Thymus. (Rechts) die Enzymaktivität der drei Polymerasen wurde ausgedrückt als Prozentsatz der Transkriptionseffizienz denaturierter (X)-Thymus-DNA.

3.3.5. Chromatographische Eigenschaften des C-Enzyms in Abhängigkeit von der Reinigungsstufe

In wiederholten Chromatographien an DEAE-Sephadex wurde die Trennung der Polymerase C in zwei (Elution mit NH_4Cl) bzw. in fünf Komponenten (Elution mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) bestätigt. Dabei stellte sich die Frage, ob die heterogenen C-Komponenten während des Präparationsgangs mit mehrmaligen Rechromatographieschritten als partielle proteolytische oder denaturierte Produkte eines gemeinsamen Ausgangsmoleküls entstehen. Um dieses Problem zu untersuchen, wurde zytoplasmatisches Ausgangsmaterial (titriert auf pH 7.9; s. Methode und Schema der Abb.1) mit Ammoniumsulfat (4 gr/10 ml) gefällt. Das Sediment wurde in Puffer 1 aufgenommen, 5 Stunden lang dagegen dialysiert und ohne Vorreinigung direkt auf DEAE-Sephadex chromatographiert (Abb.11-I). Obgleich die Trennung unter diesen Bedingungen nicht optimal ist, bleibt das Grundmuster der Mehrgipfligkeit erhalten. Im Bereich der Polymerasen CI-c und CII-a ist die Trennung nicht so deutlich wie zuvor beobachtet worden war. Dieses ist sehr wahrscheinlich zurückzuführen auf starke Verunreinigung mit anderen Proteinen, welche normalerweise bei entsprechender Vorreinigung nicht in diesem Ausmaß vorkommen.

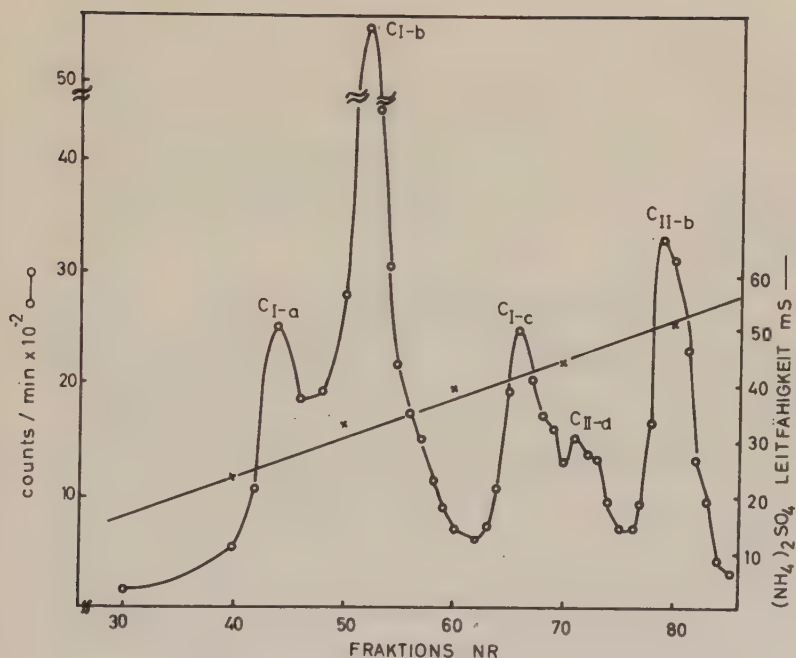


Abb.11-I Chromatographie der Polymerase C an einer (2.5x24 cm) DEAE-Sephadex A-25 Säule. Die Elutionsbedingungen waren die gleichen wie bei Abb.8. Das C-Enzym wurde ohne Vorreinigung auf DEAE-Cell. und P-Cell. chromatographiert.

Ein Funktionstest der einzelnen eluierten Gipfel mit α -Amanitin (1.0 ug/ml) bestätigte die Annahme, daß die gefundenen Enzymaktivitäten identisch sind mit den fünf zuvor beschriebenen heterogenen Komponenten des C-Enzyms.

3.3.6. Rechromatographie der Polymerase CI

In dem folgenden Experiment wurde die Polymerase CI, welche nach dem beschriebenen Schema isoliert und durch Dichtegradienten gereinigt worden war, auf einer DEAE-Sephadex-Säule chromatographiert. Wie die Abbildung 12a zeigt, wurde ein einheitlicher Enzymgipfel bei 0.29 M NH_4Cl eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen Polymerase Puffer 1 (in 0.05 M Sulfat) dialysiert und auf DEAE-Sephadex mit Ammoniumsulfat Elution rechromatographiert. Die Aktivität war wegen der großen Verdünnung des Proteins und der langwierigen Reinigungs- und Isolierungsprozeduren naturgemäß nicht sehr hoch (s. Abb.12b).

Trotzdem kann man erkennen, daß die nach NH_4Cl -Elution gewonnene Polymerase CI sich in drei heterogene Komponenten aufspalten läßt mit den entsprechenden Elutionspunkten für CI-a (31 mS), CI-b (36 mS) und CI-c (42 mS).

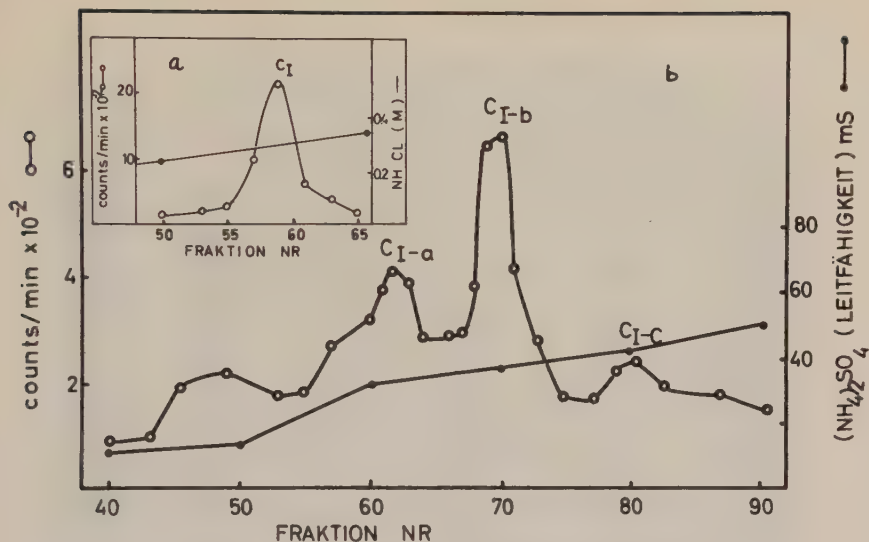


Abb.12a Chromatographie des Enzyms CI auf einer DEAE-Sephadex-Säule (2.5x24 cm) mit NH₄Cl-Elution mittels eines Gradienten von 0.0 auf 0.55 M NH₄Cl (250+250 ml in Puffer 1). Fraktionen zu 6 ml wurden gesammelt.

Abb.12b Rechromatographie der aus Abb.12a gewonnenen Polymerase CI auf DEAE-Sephadex A-25 (Säulengröße 2.5x12 cm) und Elution mittels Ammoniumsulfatgradienten von 0.05 auf 0.55 M (150+150 ml in Puffer 1). Fraktionen zu 3 ml wurden gesammelt.

3.3.7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um mögliche strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Komponenten der Polymerase C nachzuweisen, wurden die fünf Enzyme durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und in einer Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen untersucht. Dazu wurden sämtliche Fraktionen aus dem Glyzeringradienten mit Natriumdodecylsulfat und β -Mercaptoäthanol (s. Methoden) behandelt und auf 5% Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von SDS untersucht (Abb.13). Die Banden der einzelnen Gele wurden densitometrisch bei 640 nm untersucht und graphisch dargestellt (Abb.14-16). Um zu klären, welche Untereinheiten möglicherweise dem Enzym zuzuordnen sind, wurde das Auftreten und die Intensität verschiedener Banden mit dem Aktivitätsprofil nach Gradientenzentrifugation in Beziehung gebracht. Dabei konnte der Verlauf des Aktivitätsprofils von CI-a (Abb.14) mit der Migration der Bande 2 in Beziehung gebracht werden. Bei CI-b (Abb.15) korreliert die Bande 3 und mit Vorbehalt die Bande 2, und bei CI-c (Abb.16) die Bande 3 mit dem Verlauf der Enzymaktivität auf Glyzeringradienten.

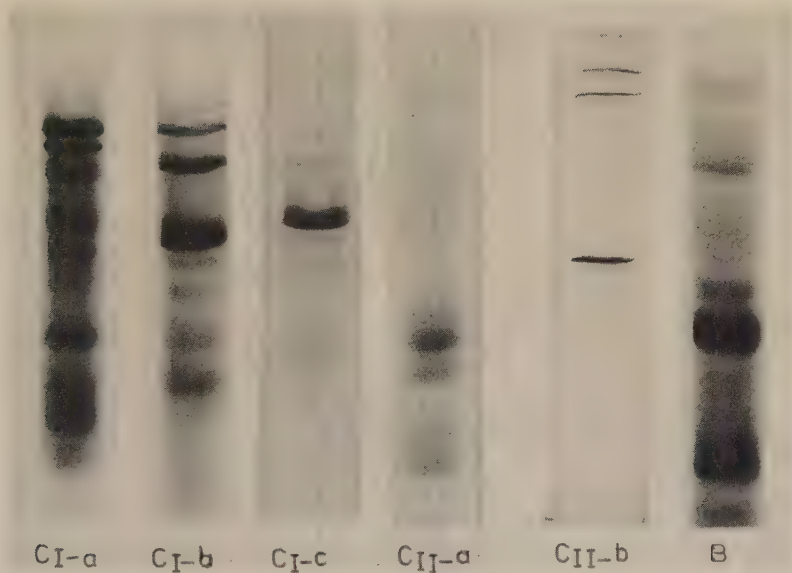


Abb.13 5%-Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese nach der Methode von Weber und Osborn (1969). Die Gipfelfractionen nach Dichtegradientenzentrifugation wurden dafür verwendet entsprechend der Gradientenverlauf bei Abb.10. Als Marker wurde das Enzym B aus Rattenleber verwendet.

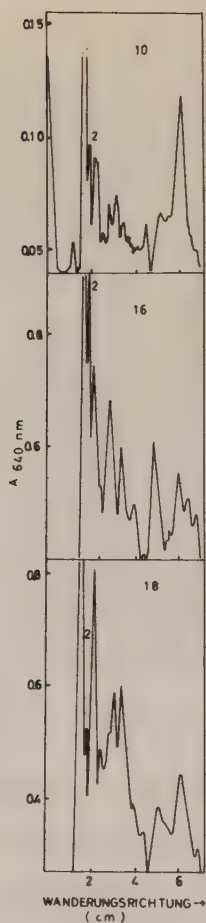


Abb. 14 Densitometrische Auswertung der Untereinheiten der Polymerase CI-a nach Elektrophorese auf 5% SDS-Polyacrylamidgelen. Die Bande 2 folgt dem Aktivitätsgipfel des Enzyms auf Glyzeringradienten. Die Fraktionen 10, 16 und 18 der Glyzeringradienten wurden untersucht (s. Abb. 10).

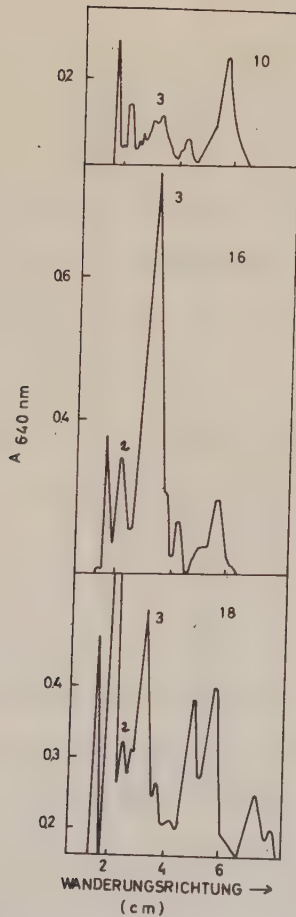


Abb.15 Densitometrische Auswertung der Untereinheiten der Polymerase CI-b nach Elektrophorese auf 5% SDS-Polyacrylamidgelen. Die Banden 3 und 2 folgen dem Enzymaktivitätsgipfel der Gradienten (s.Abb.10).

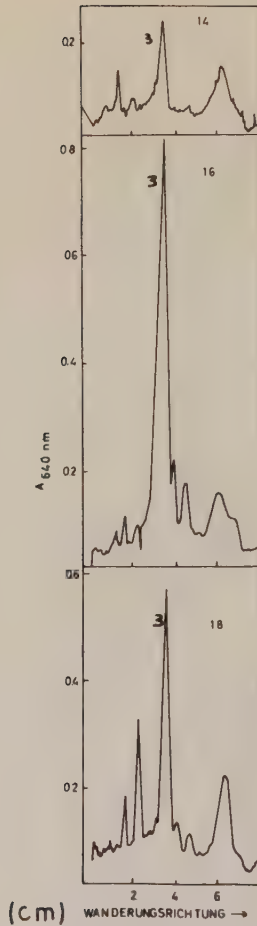


Abb.16 Densitometrische Auswertung der Polymerase
CI-c nach 5% SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese.
Die Bande 3 läuft parallel zum Enzymaktivitäts-
gipfel der Gradienten (s.Abb.10).

Eine Zuordnung einzelner Untereinheiten der RNA Polymerase CII-a und CII-b mit dem Aktivitätsprofil nach Gradientenzentrifugation konnte nicht vorgenommen werden, da die Enzyme trotz intensiver Reinigung nicht einheitlich waren. Kontaminanten mit hoher Affinität zur Polymerase wurden offenbar während aller Reinigungsschritte mitgeschleppt. Eine weitere Reinigung der Enzyme war deshalb notwendig. Der Versuch eine Chromatographie an Carboxymethyl-Sephadex bei verschiedenen pH-Werten (pH 6.8; 7.2; 7.9) durchzuführen, brachte keinen Fortschritt, da die C-Enzyme auf dieser Reinigungsstufe sich nicht mehr von den verbleibenden Kontaminanten trennen ließen.

3.3.8. DNA-Affinitätschromatographie

Zum Zweck einer besseren Entfernung der Begleitkontaminanten von den C-Komponenten wurde eine Affinitätschromatographie auf DNA-Agarose (präpariert nach der Methode von Schaller et al. 1972) verwendet. Nach Reinigung der Polymerase C bis zur Phospho-Cellulosestufe und vor der DEAE-Sephadex Chromatographie wurde dieser Schritt eingeschaltet (s. Abb. 1). Die Elution der Polymerase C von der DNA-Agarosesäule erfolgte mittels einer Ammoniumsulfatstufe (Abb. 17). Die C-Enzyme wurden gemeinsam auf der Säule absorbiert, von anderen Kontaminanten getrennt und zeigten nach Elution unter diesen

Bedingungen einen einheitlichen Enzymgipfel (s. Abb. 17). Nach dieser Vorreinigung wurde eine Chromatographie an DEAE-Sephadex durchgeführt. Die Auftrennung in die fünf mikroheterogenen Komponenten wurde wie erwartet erreicht. Der Versuch einer weiteren Reinigung der Enzyme auf Dichtegradienten mit anschließender Darstellung der Untereinheiten in den einzelnen Fraktionen war sehr schwierig, da nach diesem ausgiebigen Reinigungsverfahren fast keine Aktivität im Gradienten ermittelt werden konnte.

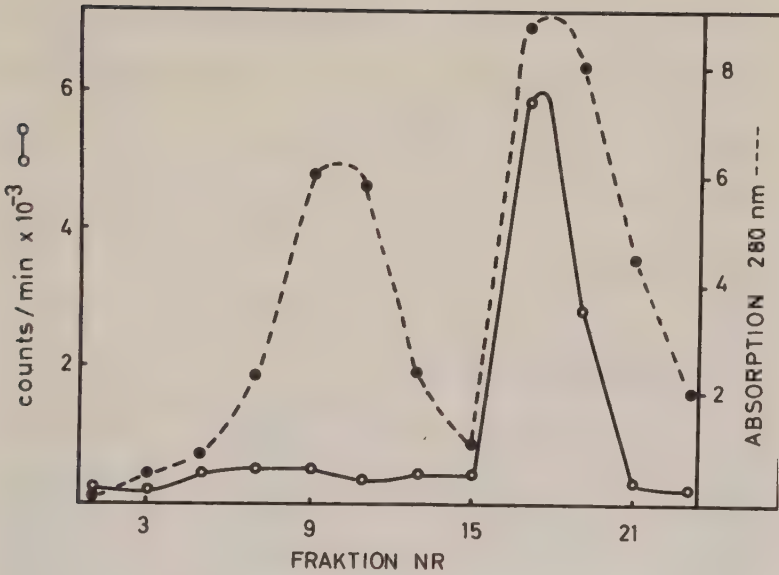


Abb.17 DNA-Affinitätschromatographie der Polymerase C. Elution erfolgte mittels 0.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Puffer 1 (200 ml). Fraktionen zu 5 ml wurden gesammelt. Die Flußrate betrug 7 ml/Std.; Säulengröße: 20x4; Gelmatrix: 80 ml (= 7 cm Säulenvolumenhöhe).

Eine Auswertung aller Isolierungs- und Reinigungsverfahren, die zur Gewinnung der heterogenen Formen des C-Enzyms angewendet wurde, ist in Tabelle 1 gezeigt.

	mg Protein/ml	Enzymaktivität cpm
<u>Überstand aus 40 Rattenleber</u>		
(890 ml)	4.64	577
Nach DEAE-Cell		
(250 ml)	0.191	780
Nach Phospho-Cell		
(80 ml)	0.081	2.252
Nach DEAE-Sephadex: (je 5 ml)		
CI-a	0.085	2.150
CI-b	0.035	1.700
CI-c	0.036	1.230
CII-a	0.0417	1.800
CII-b	0.0477	2.750
Nach Dichtegradientenzentr. (je 0.3 ml)		
CI-a	(200-350 µg/ml)	26.000
CI-b	" " "	51.000
CI-c	" " "	13.000
CII-a (1. Peak)	(150-200 µg/ml)	3.300
CII-a (2. Peak)	" " "	2.600
CII-b (1. Peak)	" " "	3.900
CII-b (2. Peak)	" " "	2.600

	mg Protein/ml	Enzymaktivität
		cpm
Nach DNA-Affinitätschrom.		
(Abzweigung nach P-Cell.)		
(10 ml)	0.178	12.239
Nach DEAE-Sephadex		
(je 5 ml)		
CI-a	(0.010-0.020 µg/ml)	1.100
CI-b	" " "	1.320
CI-c	" " "	1.440
CII-a	" " "	950
CII-b	" " "	960
Nach Dichtegradientenzentr.		
(je 0.3 ml)	(40-100 µg/ml)	
CI-a	" " "	240
CI-b	" " "	1.200
CI-c	" " "	3.300
CII-a	" " "	50
CII-b	" " "	110

4. Diskussion

Weiss und Gladstone (1959) waren die ersten, denen es gelang, in isolierten Kernen der Rattenleber eine Inkorporation von Nucleosidtriphosphaten in säurefällbares RNA-Material nachzuweisen. Diese RNA-Synthese vollzieht sich an der DNA als Matrize. In diesem Vorgang der Transkription wird die in der DNA kodierte Information auf die RNA weitergegeben, bei der verschiedene Klassen (mRNA, rRNA und tRNA) unterschieden werden. Diese Reaktion wird von dem Enzym, der DNA-abhängigen RNA Polymerase katalysiert. In Bakterien und Prokaryonten werden alle zellulären RNA-spezies von einer einzelnen Spezies dieses Enzyms transkribiert. Bei höheren, kernhaltigen Zellen hingegen, ist die Existenz drei multipler Formen der RNA Polymerase von mehreren Laboratorien nachgewiesen worden (Roeder und Rutter, 1969; Keding et al. 1970; Seifart et al., 1972).

Die Nomenklatur der eukaryonten RNA Polymerasen ist kompliziert, da unterschiedliche Kriterien zur Klassifizierung dieser Enzyme angewendet werden (s. Einführung; Chambon, 1974). Ein häufig angewendetes klassifikations-Kriterium für die drei RNA Polymerasen stützt sich auf die unterschiedlichen chromatographischen Eigenschaften dieser Enzyme an DEAE-Sephadex.

Entsprechend der Reihenfolge ihrer Elution von DEAE-Sephadex wurden diese Enzyme als RNA Polymerase I, II und III benannt. (Roeder und Rutter, 1969).

Ein anderes Kriterium der Klassifizierung ist die unterschiedliche Hemmbarkeit durch α -Amanitin (Kedinger et al., 1970; Kedinger et al., 1971; Seifart et al., 1972; Amalric et al., 1972). Das A Enzym ist α -Amanitin resistent, während das B Enzym schon bei geringer Konzentrationen des Hemmstoffs (0.05 μ g Amanitin/ml) vollständig gehemmt wird. Die Polymerase C aus verschiedenen Geweben zeichnet sich durch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber α -Amanitin aus, welche zwischen derjenigen der Enzyme A und B liegt (Seifart et al., 1972; Schwartz et al., 1974; Weinmann und Roeder, 1974).

Die Eigenschaften des aus dem Zytoplasma der Rattenleber isolierten C-Enzyms (Seifart et al., 1972) entsprechen denjenigen der aus Kernen von Amphibien-Oocyten gefundenen Polymerase III (Wilhelm et al., 1974). Die Polymerase C (oder III) wurde inzwischen auch in anderen Geweben (Austocker et al., 1974; Weil und Blatti, 1975; Seifart und Benecke, 1975; Hossenlopp et al., 1975), sowie in Zellkulturen (Sergeant und Krsmanovic, 1973; Benecke und Seifart, 1975) und in

Zelltumoren (Schwartz et al., 1974) nachgewiesen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die RNA Polymerasen A, B und C der einen Nomenklatur denen der Enzyme I, II und III der anderen entsprechen.

Es hat sich im Laufe der Zeit gezeigt, daß beide angewendeten Kriterien zur Klassifizierung der RNA Polymerasen lückenhaft sind. Die Reihenfolge der chromatographischen Elution ist abhängig von dem Organismus aus welchen das Gewebe stammt, von der Wahl des Ionenaustauschers, sowie des Elutionsmittels bei der Chromatographie. Es hat sich außerdem gezeigt, daß die RNA Polymerase C aus niederen Eukaryonten (Hefe) nicht hemmbar durch α -Amanitin ist, während das A-Enzym dieser Organismen eine gewisse Hemmbarkeit gegenüber diesem Inhibitor aufweist. Entwicklungsgeschichtlich gesehen, ist dieses eine sehr interessante Beobachtung, da sie auf deutliche molekulare Veränderungen des Enzyms im Laufe der Evolution schließen läßt. Eine neue vereinheitlichende Nomenklatur der RNA Polymerasen aus Eukaryonten ist daher dringend erforderlich, zumal gezeigt werden konnte, daß auch die RNA Polymerasen innerhalb einer einzelnen Klasse aus mehrere heterogenen Unterkomponenten bestehen. Das Elutionsverhalten und die Amanitinempfindlichkeit dieser Subkomponenten ist

bisher nur ungenügend untersucht.

Bei Chromatographie der Polymerase C aus dem Zytoplasma der Rattenleber an DEAE-Cellulose wurde beobachtet, daß dieses Enzym das gleiche Elutionsverhalten wie das A-Enzym aus Kernen aufweist (Sergeant und Krsmanovic, 1973; Austocker et al., 1974; Seifart und Benecke, 1975; Weil und Blatti, 1976). Durch Rechromatographie des gemeinsamen A+C-Bereiches auf DEAE-Sephadex A-25 und Elution mit NH_4Cl wird eine Auftrennung der Enzyme A und C ermöglicht. Die Ursache dieses unterschiedlichen chromatographischen Verhaltens an der gleichen Austauschfunktion (DEAE) ist nicht bekannt, führte aber lange Zeit dazu, daß das C-Enzym von verschiedenen Autoren, die lediglich DEAE-Cellulose benutzten, übersehen wurde. Es war daher für alle Untersuchungen zur Mikroheterogenität erforderlich sowohl DEAE-Cellulose als auch DEAE-Sephadex anzuwenden.

Die RNA Polymerase C aus dem Cytoplasma der Rattenleber zeigt nach Chromatographie an DEAE-Cellulose einen einheitlichen Gipfel. Erste Hinweise deuteten daraufhin (Benecke 1973), daß es sich dabei um eine heterogene Enzympopulation handelte und die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zu dieser Frage leisten. Es konnte bestätigt werden, daß die RNA Polymerase C der Ratten-

leber, nach Vorreinigung auf DEAE-Cellulose, an DEAE-Sephadex in mehrere Komponenten aufgetrennt werden kann. Wird die Elution mit NH_4Cl durchgeführt, erhält man zwei Komponenten CI und CII; mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ werden fünf Aktivitätsgipfel erhalten. Diese wurden mit CI-a, CI-b, CI-c und CII-a, CII-b bezeichnet, da weitere Untersuchungen ergaben, daß diese fünf Komponenten in zwei Gruppen eingeordnet werden können, die jeweils den zuvor beschriebenen Gruppen CI und CII zuzuordnen sind. Getrennte Rechromatographie dieser Komponenten zeigten, daß es sich bei dieser Beobachtung nicht um chromatographische Artefakte handelte.

Auf die Existenz mehrerer, heterogener Komponenten innerhalb der Enzymklassen A(I), B(II) und C(III) deuten auch zahlreiche Befunde anderer Laboratorien hin. Dieses wurde berichtet für Plasmacytomzellen der Maus MOPC 313 (Schwartz et al., 1974; Sklar und Roeder, 1976) für Mäuseleber (Schwartz et al., 1974) für menschliche periphere Lymphocyten (Jaehning et al., 1975) für Kalbs-Thymus (Schwartz et al., 1974) für KB-Zellen (Weinmann et al., 1974) für HeLa-Zellen (Hossenlopp et al., 1975) sowie für die Rattenleber (Seifart und Benecke, 1975). Die Mikroheterogenität innerhalb einer Enzymklasse hat unterschiedliche Ursachen und kann für

im einzelnen Enzymklassen folgendermaßen erklärt werden:

Enzym A: An- oder Abwesenheit von kleinen Untereinheiten

Enzym B: Modifikationen in den großen Untereinheiten.

Enzym C: An- oder Abwesenheit von kleinen Untereinheiten.

Im Gegensatz zu den höheren Eukaryonten ist bei niederen Eukaryonten wie der Hefe keine Heterogenität innerhalb der RNA Polymerase III nachgewiesen worden (Adman et al., 1972; Ponta et al., 1972; Young und Whiteley, 1975). Vor der Trennung der zytoplasmatischen Polymerase in ihre Unterkomponenten (CI-a, CI-b und CI-c; CII-a und CII-b) zeigten das C-Enzym gegenüber α -Amanitin eine intermediäre Hemmung, welche zwischen der des resistenten A-Enzyms aus Nucleoli und der des B-Enzyms aus dem Kernplasma liegt (Seifart et al., 1972). Es war jedoch beobachtet worden, daß die Hemmkurve keinen monotonen Verlauf hatte, welches darauf hin deutete, daß es sich um die Resultante verschiedener Vektoren handelte. Gegenüber dem ursprünglichen Befund zeigten die isolierten Unterkomponenten der Polymerase C keinesfalls die gleiche mittlere Empfindlichkeit gegenüber α -Amanitin.

Das Spektrum der Hemmbarkeit dieser Enzyme liegt zwischen denjenigen des B- und des A-Enzyms. Sie können nach ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem Inhibitor ¹(S. Abb. 5 und 9) deutlich voneinander unterschieden werden. Es wurde gefunden (Abb. 5 und 9), daß die Formen CI eine sehr viel höhere Amanitinempfindlichkeit besaßen als diejenigen der CII-Klasse. Aus diesem Grunde war es notwendig auszuschließen, daß es sich bei dem CI-Enzym um eine Kontamination mit der RNA-Polymerase B des Zellkerns handelte. Dieser Verdacht konnte jedoch durch eine gleichzeitige Rechromatographie beider Komponenten ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigten Unterformen der RNA Polymerase C aus Ovarien von *Xenopus laevis* CI und CII (Long et al., 1976) und aus Plasmacytom-Zellen der Maus, III_A und III_B (Weil und Blatti, 1976), eine identische Sensibilität gegenüber α -Amanitin. Die Ursache dieser Diskrepanz ist bisher nicht geklärt. Da aber über den genauen Bindungsmechanismus des Amanitins an das Enzym wenig bekannt ist (z.B. welche Unter-einheit bindet?), könnte es sein, daß kooperative Kräfte unterschiedlich vorhandener Untereinheiten, diese Widersprüche erklären könnten.

Die Kernpolymerasen A und B bevorzugen in vitro vor-

wiegend denaturierte DNA, während native DNA wenig effizient transkribiert wird (Seifart et al., 1972b; Chambon, 1974; Dezelée et al., 1974). Demgegenüber transkribiert die RNA Polymerase C aus HeLa-Zellen native DNA aus Adenovirus genau so gut wie die denaturierte DNA aus Kalb-Thymus (Hossenlopp et al., 1975; Wells et al., 1975; Long et al., 1976). Es war daher interessant, die einzelnen Unterformen der RNA Polymerase C aus Rattenleber nach diesem Gesichtspunkt zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß die isolierten zytoplasmatischen Polymerasen CI und CII, bzw. deren Unterformen CI-a, CI-b und CI-c, CII-a und CII-b in der Lage sind, native DNA genau so gut zu transkribieren wie denaturierte Kalbthymus DNA. Allerdings wird DNA aus Vaccinia Virus sowie aus Adenovirus-2 von diesen Enzymen nicht so gut transkribiert (s. Abb. 11a,b). Dennoch unterscheiden sich alle untersuchten Formen des C-Enzyms in dieser Eigenschaft deutlich von den Polymerasen A und B.

Zur weiteren Abgrenzung der gefundenen Subkomponenten des C-Enzyms wurde der Versuch unternommen, deren molekularen Aufbau über eine Analyse ihrer Untereinheiten zu untersuchen. Nach Zentrifugation der C-Enzyme

auf Glyzeringradienten zeigten die Polymerasen CI-a, CI-b und CI-c ungefähr das gleiche Sedimentationsprofil wie die Polymerasen A und B aus Rattenleber (s. Abb.10a), während sich die Polymerasen CII-a und CII-b in zwei Enzymgipfel trennten (Abb.10b). Eine Untersuchung von enzymatisch aktiven und nicht aktiven Fraktionen des Dichtegradienten mit Hilfe der Polyacrylamidelektrophorese unter denaturierte Bedingungen ergab, daß einer Korrelation zwischen Banden und Enzymaktivität schwierig war (s. Abb. 14, 15 und 16). Die Enzyme waren trotz der umfangreichen Reinigung noch so stark mit anderen Proteinen kontaminiert, daß zum derzeitigen Standpunkt nichts endgültiges über die Struktur der C-Enzyme ausgesagt werden kann. Da diese Enzyme aus dem Zytoplasma isoliert wurden, war ihr relativer Anteil am Gesamtprotein naturgemäß sehr niedrig. Weitergehende Reinigungsschritte führten dazu, daß zwar noch enzymatische Aktivität gefunden wurde, daß aber die Proteinkonzentration für eine Analyse der Untereinheitenstruktur nicht mehr ausreichte. Die bisher einzige Analyse zur Aufklärung der Untereinheiten der Polymerase III (Sklar und Roeder, 1976) zeigt eine sehr komplexe Struktur, welche eine Assoziation mit anderen, vor allen niedermolekularen, Proteinen nicht ausschließt und die Schwierig-

keiten zur Eindarstellung dieser Enzymklassen unterstreicht.

Die biologische Bedeutung der Polymerase C als Enzymklasse ist in der letzten Zeit aufgeklärt worden.

Weinmann und Roeder (1974) konnten nachweisen, daß die enzymatische Aktivität der Polymerase C oder III in isolierten Kernen von Myelomzellen für die Synthese der niedermolekularen RNA verantwortlich ist. Diese Ergebnisse konnten von Udvardy und Seifart (1976) für HeLa Zellkerne bestätigt werden. Darüber hinaus konnte erstmals für ein eukaryontes System der Nachweis erbracht werden (Yamamoto und Seifart, 1977, Manuskript zur Publikation vorbereitet), daß das C-Enzym in vitro in der Lage ist, vollständige und korrekte Moleküle ribosomaler 5S RNA zu synthetisieren. Eine weitere Funktion dieses Enzyms ist die Synthese der viralen 5.5S RNA in Adenovirus-2 infizierten KB-Zellen (Weinmann et al., 1974).

Der Evolution von Prokaryonten zu Eukaryonten folgte die Entstehung multipler Formen der RNA Polymerasen. Damit erfolgte auch eine Spezialisierung der RNA Polymerasen bei der Transkription verschiedener Gene. Es ist bisher nicht erwiesen, ob alle niedermolekularen RNA-Spezies von ein und demselben Enzym transkribiert

werden, oder ob einzelne der heterogenen C-Komponenten möglicherweise für die spezifische Transkription von z.B. der pre-tRNA oder der 5S RNA-Gene, oder anderer niedermolekularer RNA-Spezies verantwortlich sind. Der Nachweis dieser äußerst interessanten Hypothese wird möglicherweise durch gezielte Hybridisierungsversuche mit isolierten, klonierten Genen möglich sein.

Die fünf Formen der RNA Polymerase C der Rattenleber stellen die größte Heterogenität dar, die bisher bei der RNA Polymerase gefunden worden ist. Es ist bislang jedoch nicht ausgeschlossen, daß diese Beobachtung auf einer proteolytischen Modifikation beruht wie dieses für die Unterformen des B-Enzyms von Weaver, et al. (1971) diskutiert worden ist. Bisherige Untersuchungen, die mit dem Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid unternommen wurden, haben diese Alternative nicht gestützt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die multiplen Komponenten nicht im Laufe der Reinigung entstehen, sondern daß sie bereits in frühen Reinigungsstadien nachzuweisen sind (s. Ergebnisse, Seite 36 und Abb.11-I).

Ein direkter Beweis, daß die heterogenen C-Enzyme aus Rattenleber eigenständige, funktionelle Proteine sind, könnte durch Gewinnung spezifischer Antikörper gegen diese Enzymklassen erbracht werden. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, in Kaninchen, Meerschwein-

chen und Enten ein Globulin gegen die gereinigte Polymerase B aus Rattenleber zu erzeugen. Diese Versuche haben bisher keine spezifischen Antikörper erbracht. Allerdings ist berichtet worden, daß Antikörper gegen die Polymerase A aus Kalbthymus (Kedinger et al., 1974), aus Hefe (Sebastian, 1973) und Polymerase B aus Drosophila (Greenleaf und Bautz, 1975) erzielt werden konnten, sodaß es nicht ausgeschlossen erscheint, spezifische Antikörper gegen die einzelnen C-Komponenten herzustellen.

Da alle untersuchten Punkte dieser Arbeit für die Existenz der heterogenen Formen des C-Enzyms im Zytoplasma sprechen, müssen diese Enzymklassen als eigenständige Proteine betrachtet werden. Die Frage, warum diese Enzyme im Zytoplasma lokalisiert sind, ist bisher ungeklärt. Es könnte sein, daß sie eine Art "enzymatisches Reservoir" an RNA Polymerase C darstellen, welches je nach Synthesebedarf in den Kern eingeschleust werden könnte. Da die Gene für die niedermolekularen RNA-Spezies sehr klein sind und maximal ein bis zwei Polymerasemoleküle gleichzeitig aufnehmen können (Udvardy und Seifart, 1976) ist wahrscheinlich, daß ein erheblicher Teil dieses Enzyms in freier Form vorliegt. Dieses könnte auch ein freieres Gleichgewicht zwischen Kern und Zytoplasma zur Folge haben.

5. Zusammenfassung

Das Zytoplasma der Rattenleber enthält deutlich meßbare Mengen an DNA-abhängiger RNA Polymerase C. Es wurde in dieser Arbeit gefunden, daß sich diese Enzymaktivität in mehrere Unterformen trennen läßt. Nach Chromatographie an DEAE-Sephadex und Elution mit NH_4Cl lassen sich zwei Komponenten, CI und CII nachweisen; nach Elution der Säule mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gelingt die Trennung in fünf Einzelkomponenten, CI-a, CI-b, CI-c, CII-a und CII-b.

Vor der Trennung der Polymerase C aus Zytoplasma in ihre Unterkomponenten (CI-a, CI-b und CI-c; CII-a und CII-c) zeigt das C-Enzym gegenüber α -Amanitin eine intermediäre Hemmung, welche zwischen der des resistenten A-Enzyms aus Nucleoli und der des B-Enzyms aus dem Kernplasma liegt. Werden die Unterkomponenten des C-Enzyms aus Zytoplasma isoliert, zeigen die Enzyme der Gruppe CI und CII jedoch eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber α -Amanitin. Die Formen CI zeigen eine sehr viel höhere Amanitinempfindlichkeit als diejenigen der CII-Klasse. Eine Kontamination der Formen CI mit dem B-Enzym des Kerns konnte durch gleichzeitige Rechromatographie beider Komponenten ausgeschlossen werden. Durch Rechromatographie der einzelnen C-Komponenten konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um Artefakte der Chromatographie handelte. Durch eine direkte Chromatographie des Ausgangsmaterials an DEAE-Sephadex konnte fernerhin gezeigt werden, daß die

multiplen Formen der RNA Polymerase C nicht während der Reinigung entstehen. Die Gegenwart von Protease-Inhibitoren (PMSF) konnte das Auftreten der multiplen Formen ebenfalls nicht verhindern.

Im Gegensatz zu den RNA Polymerasen A und B sind alle Unterformen der Polymerase C in der Lage, native DNA genauso gut zu transkribieren wie denaturierte Kalbthymus DNA. Native DNA aus Vacciria und Adenovirus wird zwar weniger effizient als deren denaturierte Form transkribiert, das Enzym B hingegen transkribiert diese nativen Matrizen nahezu gar nicht.

Eine Analyse der Untereinheiten-Struktur der einzelnen Formen der RNA Polymerase C wurde angestrebt. Diese Untersuchungen konnten nicht zum Abschluß gebracht werden, da die Preoteinmenge dieser Enzyme im Verhältnis zum Restprotein des Zytoplasmas für strukturelle Untersuchungen zu gering war. Der genaue Grund, warum diese Enzyme im Zytoplasma lokalisiert sind, ist nicht bekannt. Dieses hängt aber möglicherweise damit zusammen, daß die Gene, welche dieses Enzym transkribiert, relativ klein sind und daß ein verhältnismäßig großer Teil des Enzyms deshalb in "freier" Form vorkommt.

Die möglichen Schlußfolgerungen für die multiplen C-Enzyme im Zusammenhang mit der Transkription verschiedener, für niedermolekulare RNA kodierende, Gene wurde diskutiert.

Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
cpm	Impulse pro Minute
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung bei Zentrifugation
GMP	Guanosinmonophosphat
mA	Milli-Ampère
mS	Milli-Siemens
POPOP	2.2 -p-Phenylenbis- (5-phenyloxazol)
PPO	2.5 -Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-RNA
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Sedimentationskonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
TSS	Tris-Sucrose-Salz
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UTP	Uridintriphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride

Literaturverzeichnis

- Adman, R., L.D. Schultz, und B.D.Hall 1972. Transcription in Yeast: Separation and Properties of Multiple RNA Polymerases. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1702-1706
- Amalric, F., M. Nicoloso, und J.P. Zalta, 1972. A Comparative Study of "Soluble" RNA Polymerase Activity of Zajdela Hepatoma Ascites Cells and Calf Thymus. FEBS Letters 22, 67-72
- Autostocker, J.L., T.J.C. Beebe, C.J. Chesterton und P.H.W. Butterworth, 1974. Cell 3, 227-234
- Benecke, B.J., 1973. Dissertation-Universität Marburg
- Coupar, B., und C. Chesterton, 1975. Purification of Form AI and AII DNA-Dependent RNA Polymerases from Rat-Liver Nucleoli using Low-Ionic-Strength Extraction Conditions. Eur. J. Chem. 59, 25-34
- Chambon, P., 1974. In the Enzymes. Vol X, S. 261, 3. Ed. Academic Press
- Chambon, P., 1975a. Ann. Rev. Biochem. 43, 613-638
- Chesterton, C.J., und P.H.W. Butterworth, 1971a. A New Form of Mammalian DNA-Dependent RNA Polymerase and its Relationship to the Known Forms of the Enzyme. FEBS Letters XII, 301-308

- Chesterton, C.J., und P.H.W. Butterworth, 1971b. Selective Extraction of Form I DNA Dependent RNA Polymerase from Rat Liver Nuclei and its Separation into Two Species. *Eur. J. Biochem.* 19, 232-241
- Chesterton, C.J., und P.H.W. Butterworth, 1971c. Purification of the Rat Liver Form B DNA-Dependent RNA Polymerases. *FEBS Letters* 15, 181-185
- Froehner, S.C., und J. Bonner, 1973. Ascites Tumor Ribonucleic Acid Polymerases, Isolation, Purification, and Factor Stimulation. *Biochemistry* 12, 3064-3071
- Hossenlopp, P., D. Wells, und P. Chambon, 1975. Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. *Eur. J. Biochem.* 58, 237-251
- Jachning, J.A., C.C. Stewart, und R.G. Roeder, 1975. DNA-Dependent RNA Polymerase Levels during the Response of Human Peripheral Lymphocytes to Phytohemagglutinin. *Cell* 4, 51-57
- Kedinger, C., M. Gniazdowski, T.L. Mandel Jr., F. Gissinger, und P. Chambon, 1970. Amanitin: A Specific Inhibitor of One of Two DNA-Dependent RNA Polymerase Activities from Calf Thymus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 165-171

- Kedinger, C., P. Nuret, und P. Chambon, 1971. Structural Evidence for Two -Amanitin Sensitive RNA Polymerases in Calf Thymus. FEBS Letters 15, 169-174
- Kedinger, C., F. Gissinger, und P. Chambon, 1974. Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. Eur. J. Biochem. 44, 421-436
- Krebs, C., und P. Chambon, 1976. Animal DNA-Dependent RNA Polymerases. Eur. J. Biochem. 61, 15-25
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, und R.I. Randall, 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Long, E., D. Dina, und M. Crippa, 1976. DNA-Dependent RNA Polymerase C from *Xenopus laevis* Ovaries. Eur. J. Biochem. 66, 269-275
- Marzluff, W.F., E.C. Murphy, und R.Ch.C. Huang, 1974. Transcription of the Genes for 5S Ribosomal RNA and Transfer RNA in Isolated Mouse Myeloma Cell Nuclei. Biochemistry 13, 3689-3696
- Phillips, J., und H.S. Forrest, 1973. Deoxyribonucleic Acid-dependent Ribonucleic Acid Polymerase from *Drosophila melanogaster* Embryos. J. Biol. Chem. 248, 265-269

- Ponta, H., J. Pouta, und E. Wintersberger, 1972. Purification and Properties of DNA-Dependent RNA Polymerases from Yeast. *Eur. J. Biochem.* 29, 110-118
- Price, R., und S. Penman, 1972. A Distinct RNA Polymerase Activity, Synthesizing 5S, 5S and 4S RNA in Nucleic from Adenovirus 2-infected HeLa Cells. *J. Mol. Biol.* 70, 435-470
- Roeder, R.G., und W.J. Rutter, 1969b. Multiple Forms of DNA-dependent RNA Polymerase in Eukaryotic Organisms. *Nature (Lond.)* 224, 234-237
- Roeder, R.G., und W.J. Rutter, 1970. Specific Nucleolar and Nucleoplasmic RNA Polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 65, 675-682
- Roeder, R.G., 1974a. Multiple Forms of Deoxyribonucleic Acid-dependent Ribonucleic Acid Polymerase in *Xeropus laevis*-Isolation and Partial Characterisation-. *J. Biol. Chem.* 249, 241-248
- Roeder, R.G., 1974b. Levels of Activity During Oocyte and Embryonic Development-. *J. Biol. Chem.* 249, 249-256
- Roeder, R.G., S.M. Chou, J.A. Jaehning, L.B. Schwartz, V.E.F. Sklar, R. Weinmann (1974), in *Isozymes III, Developmental Biology*, ed. Market, C.L.

Sebastian, J., A. Hildebrandt, und H.O. Halvorson, 1973.

Immunological Cross Reaction Between the RNA Polymerase I and II from Yeast. Fed. Proc. 32, 646

Seifart, K.H., B.J. Benecke, 1972. Multiple RNA Polymerase

Species from Rat Liver Tissue: Possible Existence of a Cytoplasmic Enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 151, 519-532

Seifart, K.H., B.J. Benecke, 1975. DNA-Dependent RNA

Polymerase C. Occurrence and Localisation in Various Animal Cells. Eur. J. Biochem. 53, 293-300

Schwartz, L.B., V.E.F. Sklar, J.A. Jaehning, R. Weinmann,

und R.G. Roeder, 1974. Isolation and Partial Characterisation of the Multiple Forms of Deoxyribonucleic Acid-dependent Ribonucleic Acid Polymerase in the Mouse Myeloma, MOPC 315. J. Biol. Chem. 249, 5889-5897

Sergeant, A., und V. Krsmanovic, 1973. KB Cell RNA Poly-

merases: Occurrence of Nucleoplasmic Enzyme III. FEBS Letters 35, 331-335

Sklar, V.E.F., und R.G. Roeder, 1976. Animal DNA-Dependent

RNA Polymerases. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 34, 2448

- Sklar, V.E.F., und R.G. Roeder, 1976. Purification and Subunit Structure of Deoxyribonucleic Acid-dependent Ribonucleic Acid Polymerase III from the Mouse Plasmacytoma, MOPC 315. J. Biol. Chem. 254, 1064-1073
- Smuckler, E., und J.R. Tata, 1971. Changes in hepatic nuclear DNA-dependent RNA polymerase caused by Growth Hormone and Triiodothyronine. Nature 234, 37-39
- Sugden, B., und W. Keller, 1973. Mammalian Deoxyribonucleic Acid-dependent Ribonucleic Acid Polymerases. J. Biol. Chem. 248, 3777-3788
- Udvardy, A., und K.H. Seifart, 1976. Transcription of Specific Genes in Isolated Nucleic from HeLa Cells in vitro. Eur. J. Biochem. 62, 353-363
- Watson, J.D., 1970. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 641-742
- Weber, K., und M. Osborn, 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
- Weil, P.A., und S.P. Platti, 1975. Partial Purification and Properties of Calf Thymus Deoxyribonucleic Acid Dependent RNA Polymerase III. Biochemistry 14, 1636-1642

- Weil, P.A., und S.P. Blatti, 1976. HeLa Cell Deoxyribonucleic Acid Dependent RNA Polymerases: Function and Properties of the Class III Enzymes. *Biochemistry* 15, 1500-1509
- Weiss, S.B., und L.W. Gladstone, 1959. *JACS* 81, 4118
- Wells, D., 1975. In *Biochemistry of the Cell Nucleus*. Hidvégi, E. eds., North Holland Publ. Co. Amsterdam S. 275-288
- Weinmann, R., und R.G. Roeder, 1974a. Role of DNA-Dependent RNA Polymerase III in the Transcription of the tRNA and 5S RNA Genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1790-1794
- Weinmann, R., und R.G. Roeder, et al., 1974b. Role of DNA-Dependent RNA Polymerase II and III in Transcription of the Adenovirus Genome Late in Productive Infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 3426-3430
- Weinmann, R., und R.G. Roeder, 1974c. Role of DNA-Dependent RNA Polymerase III in 5S and 4S RNA Synthesis. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 33, 1349-1354
- Weaver, R.F., S.P. Blatti, und W.J. Rutter, 1971. *Proc. Nat. Acad. U.S.A.* 68, 2994-2999

- Weinmann, R., T.G. Brendler, H.I. Raskas, und R.G. Roeder, 1976. Low Molecular Weight RNAs Transcribed by RNA Polymerase III during Adenovirus 2 Infection. Cell 7, 557-566
- Wilhelm, J., D. Dina, und M. Crippa, 1974. A special Form of Deoxyribonucleic Acid Dependent Ribonucleic Acid Polymerase from Oocytes of *Xenopus Laevis*. Isolation and Characterization. Biochemistry 13, 1200-1208
- Young, H.A., und H.R. Whiteley, 1975. Deoxyribonucleic Acid-dependent Ribonucleic Acid Polymerases in the Dimorphic Fungus *Mucor rouxii*. J. Biol. Chem. 250, 479-487

Für die Hilfeleistungen danke ich
der technischen Assistentin .
D. Schwarz.

Lebenslauf

- 1.1.1942 geboren in Jerez als Sohn des
Architekts Antonio Gasca und
seiner Ehefrau Dolores Jimenez
- 1949-1956 Besuch der kath. Grund- und Mittel-
schule in Las Palmas
- 1957-1962 Besuch des Liceums "Gustavo Herrera"
in Caracas
- 24.11.1962 Reifeprüfung
- 1964-1965 Studium der Deutschen Sprache am Herder-
Institut in Leipzig
- 1965-1970 Studium der Biologie an der Friedrich
Schiller Universität zu Jena
- 16.7.1970 Staatsexamen zur Erlangung des Diploms
rer. nat. in Biologie
- 1971-1973 Forschungs- und Lehrauftrag an der
Sektion Biochemie der Medizinischen
Fakultät der Universidad de Oriente,
Venezuela.
- 1.11.1973 Beginn der vorliegenden Koktorarbeit am
Institut für Physiologische Chemie der
Philipps-Universität Marburg unter Leitung
von Herrn Prof. Dr. K. Scifart

